

UNTERSUCHUNG DER TRANSKRIPTREIFUNG
AM MITOCHONDRIALEN
CYTOCHROM B-GEN DER SPALTHEFE
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE AM WILDTYP UND
CYTOCHROM B-DEFEKTEN MITOCHONDRIALEN
DELETIONSMUTANTEN

DISSERTATION
der Fakultät für Biologie
durchgeführt am Institut für
Genetik und Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Sonja Distler

März 1986

UNTERSUCHUNG DER TRANSKRIPTREIFUNG
AM MITOCHONDRIALEN
CYTOCHROM B-GEN DER SPALTHEFE
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE AM WILDTYP UND
CYTOCHROM B-DEFEKTEN MITOCHONDRIALEN
DELETIONSMUTANTEN

DISSERTATION

der Fakultät für Biologie

durchgeführt am Institut für

Genetik und Mikrobiologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Sonja Distler

März 1986

UNTERSUCHUNG DER TRANSKRIPTION

AM MITOCHONDRIEN

CYTOCHROM B GEN DES SPALTSTREIFENS

SCHIZOSACHARINIDES FORME AM WILDTYP UND

CYTOCHROM B-DEFIZIEN MITOCHONDRIEN

DELETIONSMUTANTEN

DIPLOMAT

der Fakultät für Biologie

der Universität zu Köln

Chemie und Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Wolf

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 1986

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG.....	1
11. MATERIAL UND METHODEN.....	13
1. Material.....	13
1.1. Abkürzungen.....	13
1.2. Nomenklatur der Gene.....	14
1.3. Feinchemikalien.....	15
1.4. Radiochemikalien und Enzyme.....	16
1.5. Medien und Puffer.....	17
1.6. Stämme und Klone.....	24
1.6.1. <i>S. pombe</i> -Stämme.....	24
1.6.2. Bakterienstämme.....	25
1.6.3. Plasmidstämme.....	25
2. Methoden.....	25
2.1. Anzucht von <i>S. pombe</i> 50 und Mutanten.....	25
2.2. Präparation der mt RNA.....	25
2.3. Reinigung der mt RNA.....	25
2.4. Elektrophoretische Auftrennung der mt RNA auf denaturierenden Gelen.....	26
2.4.1. Harnstoff-Agarose-Gel.....	26
2.4.2. Quecksilber-Agarose-Gel.....	26
2.4.3. Glyoxalgel.....	26
2.5. UV-Photographie der Harnstoff- bzw. Quecksilber-Agarose-Gele.....	26
2.6. Northern-Hybridisierung.....	27

2.7.	Isolation spezifischer mt RNA-Banden aus Harnstoff-Agarose-Gelen.....	27
2.8.	Präparation von mt DNA.....	27
2.9.	Reinigung der mt DNA.....	27
2.10.	Restriktion der mt DNA bzw. Plasmid-DNA.....	28
2.11.	Auftrennung restringierter mt DNA auf Agarose-Gelen.....	28
2.12.	Auftrennung restringierter mt DNA auf Acrylamid-Gelen und Reisolation der mt DNA-Banden.....	28
2.13.	Alpha- ³² -Phosphat-Markierung der mt DNA durch Nicktranslation....	28
2.14.	Southerntransfer und Hybridisierung mit heterologen DNA-Proben.....	29
2.15.	Plasmidpräparation.....	29
2.15.1.	Plasmidpräparation durch alkalische Lyse.....	29
2.15.2.	Plasmidpräparation nach Clewell.....	29
2.16.	Endmarkierung doppelsträngiger und einzelsträngiger mt DNA.....	29
2.16.1.	Radioaktive Markierung der 5'-Enden doppelsträngiger DNA mit gamma-ATP.....	29
2.16.2.	Radioaktive Markierung der 3'-Enden doppelsträngiger DNA mit alpha-ATP.....	30
2.16.3.	Radioaktive Markierung der 3'-Enden doppelsträngiger DNA mit Cordycepin.....	30
2.16.4.	Radioaktive Markierung des 5'-Endes einzelsträngiger DNA mit gamma-ATP.....	30
2.17	Strangtrennung.....	30
2.18.	DNA-Sequenzierung.....	30
2.19.	S1-Nuklease-Technik.....	31
2.20.	Primer-Extension mit reverser Transkriptase.....	31
2.21.	SP6-Klonierung.....	31
2.22.	In vitro-Transkription.....	31
2.23.	In vitro-Spleiß-Reaktion.....	31

2.24.	Transkriptkartierung mit RNase T1 und A ("S1-Typ"-Kartierung).....	32
III.	ERGEBNISSE.....	33
A.	Überblick über bisher bekannte Daten der Transkriptreifung in den Mitochondrien von <i>S. pombe</i> , Stamm 50.....	33
B.	Transkripte im Cytochrom b-Bereich des Stammes 50.....	35
1.	Transkriptcharakterisierung im Cytochrom b-Bereich.....	35
1.1.	Exontranskripte des Cytochrom b-Gens.....	37
1.2.	Introntranskripte des Cytochrom b-Gens.....	37
2.	Transkriptkartierung im Cytochrom b-Bereich.....	41
2.1.	Reifes cob-Transkript.....	41
2.1.1.	Transkriptkartierung durch Northern-Hybridisierung.....	41
2.1.2.	Transkriptkartierung durch S1-Analysen.....	41
2.1.2.1.	Leader.....	44
2.1.2.2.	Trailer.....	45
2.1.2.3.	Exon1/Exon2-übergang.....	47
2.1.3.	Transkriptkartierung durch Primer-Extension.....	47
2.2.	Introntranskripte.....	48
2.2.1.	Längenfestlegung durch S1-Analyse und Primer-Extension.....	48
2.2.2.	Auftreten eines Transkriptes aus Intron- und Exonanteilen.....	54
2.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Transkriptkartierung im cob-Gen.....	57
3.	Untersuchungen der Natur der Introntranskripte Stamm 50.....	59
3.1.	Unterscheidung der beiden Intron-RNA-Spezies.....	59
3.1.1.	Southern-Hybridisierung.....	59

3.1.2.	Ist das 2300 b-Transkript eine Verkürzung des 2500 b-Transkriptes?.....	59
3.1.3.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	61
3.1.4.	Gibt es ein "Intron im Intron"?.....	65
3.1.4.1.	SP6-Klonierung und in vitro-Transkription.....	66
3.1.4.2.	RNA-Kartierung mit RNase T1 und A (*S1 Typ"-Kartierung).....	71
3.1.5.	Spezifische Hybridisierungen der mt RNA mit verschiedenen Oligonukleotiden.....	72
3.1.6.	Überprüfung der beiden Introntranskripte auf verschiedene Sekundärstrukturausbildung des gleichen Moleküles.....	77
3.2.	Untersuchung auf Selbstspießen des Gruppe II-Introns aus dem Cytochrom b-Gen.....	79
3.2.1.	SP6-Klonierung.....	80
3.2.2.	In vitro-Transkription.....	83
3.2.3.	In vitro-Spleißen.....	83
3.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen zur Natur der Introntranskripte.....	87
C.	Mutanten.....	88
1.	Phänotyp und Deletionsorte der Mutanten.....	88
2.	Transkriptcharakterisierung.....	88
2.1.	Auftrennung der mt RNA auf Harnstoff-Agarose-Gelen (bzw. Quecksilber-Agarose-Gelen) und Anfärbung mit Ethidiumbromid.....	91
2.2.	Northern-Analysen.....	91
3.	Transkriptkartierung.....	100
3.1.	S1-Analysen.....	100
3.1.1.	Leader.....	101
3.1.2.	Trailer.....	101

3.1.3.	Anfangs- und Endpunkte der Exons.....	102
3.1.4.	Anfangs- und Endpunkte des Introns.....	102
3.2.	Transkript mit 5'-Ende im Intron und Exon 2-Anteilen.....	103
4.	Die Deletion der Mutante diu145 umfaßt den 5'-Intronspleißpunkt.....	105
4.1.	Untersuchung des Präkursor-Transkriptes aus Mutante diu145 durch Primer-Extension.....	106
4.2.	Primer-Extension mit Intron-Primer und isolierter Intron-RNA aus Mutante diu145 zur Identifizierung des neuen Spleißpunktes..	106
5.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Transkriptuntersuchungen für Cytochrom b-defekte Deletionsmutanten.....	111
IV.	DISKUSSION.....	112
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	134
VI.	LITERATURVERZEICHNIS.....	138

I. EINLEITUNG

Nach der herkömmlichen Definition wird ein Gen als ein Abschnitt auf der DNA definiert, der die Information für die Herstellung eines Polypeptids trägt. Seit 1977 fand man jedoch in zunehmendem Maße Gene, die außer diesen Informationen andere zusätzliche Sequenzen enthielten; diese Zusatzinformationen waren in der reifen mRNA für das entsprechende Gen nicht mehr enthalten. Man erkannte, daß es sich hier um sogenannte "intervenierende Sequenzen" oder "Introns" handelte, die auf DNA-Ebene auftreten, in der Prä-RNA vorhanden sind und durch "Prozessieren" dieser RNA posttranskriptional entfernt werden. Solche Gene, auch Mosaikgene genannt, wurden zunächst für tRNAs gefunden (Goodman et al., 1977; Valenzuela et al., 1978), dann auch für rRNA-Gene von *Drosophila* (Gloves et al., 1978) und verschiedene proteinkodierende Gene von Eukaryonten und deren Viren (Review: Crick et al., 1979). Inzwischen wurden im mt Genom zahlreicher Organismen (nicht jedoch bei Säugern) ebenfalls Mosaikgene gefunden (z.B. Heyting et al., 1979; Slonimski et al., 1978; Van Ommen et al., 1979). Neueste Befunde zeigen, daß es auch bei den Archaeobakterien (Kaine et al., 1983; Daniels et al., 1985), sowie beim Bakteriophagen T4 intronhaltige Gene gibt (Schmidt, 1985).

Je nach dem Mechanismus des Entfernens der Introns kann man die eukaryotischen Introns in drei verschiedene Klassen einteilen (Greer und Abelson, 1984).

Klasse 1: Introns in proteinkodierenden Genen des Zellkerns,

Klasse 2: Introns in den Genen von Chloroplasten- und Mitochondriengenomen und in den Genen für rRNA im Zellkern verschiedener Einzeller und

Klasse 3: Introns in tRNA-Genen des Zellkerns

Während die für die Reifung der tRNA-Gene benötigten Enzyme vor allem Sequenzen und/oder die räumliche Struktur der Exonanteile erkennen (Greer und Abelson, 1984), spielen bei den proteinkodierenden Genen des Zellkerns die Sequenzen an den Übergängen von Exons und Introns eine große Rolle; diese Sequenzen sind in allen Fällen nahezu identisch und lassen sich verallgemeinert wie folgt formulieren: 5'...^ACAG^aguga^Ugu...^U(py)6xcagGG...3'; wobei die Großbuchstaben Exonanteile, die Kleinbuchstaben Intronanteile des Genes darstellen. Einen Beweis für die Bedeutung dieser Sequenzen liefern Mutanten, die diese Sequenzen betreffen; sie sind nicht mehr in der Lage, korrektes Spleißen durchzuführen. Beim Menschen kann eine solche Mutation z.B. im Beta-Globin-Gen zu Beta-Thalassämie führen, eine Art der Blutarmut, die auf eine starke Reduktion der Hämoglobinpolypeptidkettensynthese zurückzuführen ist (Treisman et al., 1983). Diese Reduktion rührt in diesem Falle daher, daß durch die Mutation an den Exon/Introngrenzen des Beta-Globin-Genes ein akkurates Spleißen der RNA, d.h. Herausschneiden des Introns und Ligation der Exonanteile, nicht mehr stattfindet und somit weniger funktionsfähige Beta-Globinketten hergestellt werden können.

Bei den Introns der proteinkodierenden Gene des Zellkernes gibt es außerdem noch Hinweise, daß für das Spleißen der RNA sogenannte snRNPs (= small nuclear ribonucleo particles) beteiligt sind; das sind kleine Partikel aus Protein und RNA, die sich im Zellkern befinden (Review: Lewin, 1980).

Bei der Untersuchung der Reifungsschritte dieser zunächst intronhaltigen RNA-Moleküle stellte sich heraus, daß verschiedene RNA-Intermediate auftreten. Zunächst wird das 5'-Ende des Introns erkannt und endonukleolytisch geschnitten; der 5'-Guanosinrest des Introns bildet mit dem Adenosinrest einer nahe dem 3'-Ende des Introns gelegenen Konsensussequenz (PyXPyTPuAPy, wobei X für jede beliebige der vier Basen steht; Ruskin et al., 1984) eine 2'-5'-Phosphodiesterbindung aus und formt

sich somit zu einer Lariatstruktur, d.h. einem zirkulären Molekül, das einen linearen Schwanzteil, bestehend aus den Restsequenzen des Introns und Exon2, trägt. Nach Schneiden am 3'-Ende des Introns (und somit Entfernung des 2. Exons vom Intron) werden die beiden Exonanteile miteinander verknüpft, das Intron bleibt als Lariat bestehen (Review: Keller, 1984).

Die Situation bei Introns in Chloroplasten- oder Mitochondriengenomen, wie in den nukleären rRNA-Genen verschiedener Einzeller unterscheidet sich wiederum in einigen Punkten von den bereits erwähnten Introns. Bei ihnen findet man kurze konservierte Sequenzen innerhalb des Introns. Sie erscheinen in immer gleicher Abfolge und sind einander komplementär. Mutationen in diesen konservierten Sequenzabschnitten führen zum Ausfall der Spleißreaktion, weil die Basenpaarungen und somit die Stabilität der Sekundärstruktur im Intron nicht mehr gewährleistet sind. Eine zweite Mutation im komplementären Sequenzabschnitt kann die Auswirkung der ersten Mutation aufheben (kompensatorischer Basenaustausch; z.B. Weiss-Brummer et al., 1983; Schmelzer et al., 1983), indem sie die Stabilität der Basenpaarungen durch Sekundärmutation genau an dem gegenüberliegenden Ort wieder herstellt, an dem sich die Mutation ereignet hat.

Dujon und Mitarbeiter (Michel et al., 1982; Michel und Dujon, 1983) haben diese oben erwähnten Introns (mit konservierten Sequenzabschnitten innerhalb des Introns) in zwei Gruppen eingeteilt; sie versuchten mit Hilfe des Computers unter Berücksichtigung der Komplementarität der konservierten Sequenzabschnitte mögliche Sekundärfaltungen der Intron-RNA herzustellen.

Während die Gruppe I sehr viele Vertreter enthält, ist die Gruppe II relativ klein (eine Auflistung verschiedener Introns aus Kern, Mitochondrien und Chloroplasten und ihre Zugehörigkeit zu den verschiedenen Gruppen sind in Tabelle 1 dargestellt). Die Gruppe I-Introns sind bereits relativ gut

Lokalisation des Introns in der Zelle	Organismus	Gruppe I	Gruppe II
Nukleus	T. thermoph.	LrRNA: I	
	T. pigmentosa	LrRNA: I	
	Physarum polycephalum	LrRNA: I	
Mitochondrien	S. cer.	cob: 12	11
		13	
		14	
		cox1: 13	cox1: 11 *
		14	12 *
		15alpha	15gamma
		15beta	17
		LrRNA: I	
	K. thermotol.	LrRNA: I	
	A. nid.	cob: 1	
		cox1: 11	
		12	
		13	
		LrRNA: I	
	N. crassa	cob: 11	
		12	
		LrRNA: I	
		oli2: 1	
		URF5: 1	
	S. pombe 50	cox1: 11	cob: I *
		12	
	S. pombe EF1	cox1: 12a	
		12b	
		13	
	P. anserina	URF1: 1	cox1: 11 *
	Zea mays		cox1: I
Chloroplasten	Zea mays	trn ^{Leu} : I	trn ^{Ala} : I
			trn ^{Ala} : I
	Vicia faba	trn ^{Leu} : I	

Tabelle 1:

Tabelle 1: Zugehörigkeit verschiedener Introns zu den zwei Gruppen nach Michel et al. (1982)

Zeichenerklärung:

I = Intron

* = Intron mit offenem Leserahmen der Gruppe II

A. nid. = *Aspergillus nidulans*

K. thermotol. = *Kluyveromyces thermotolerans*

P. = *Podospora*

T. = *Tetrahymena*

thermoph. = *thermophila*

Daten aus: Michel et al., 1982; Michel und Dujon, 1983;
Waring et al., 1984; Bonnard et al., 1984 und Burger et al.,
1985.

untersucht (z.B. Weiss-Brummer et al., 1983; Schmelzer et al., 1983; Waring et al., 1981), und so wurden einige gemeinsame Eigenschaften dieser Introns erkannt: Michel et al. (1982), Michel und Dujon (1983) und Davies et al. (1982) fanden übereinstimmend, daß es in diesen Introns mehrere konservierte Nukleotidsequenzen gibt, die nach Davies et al. (1982) P, Q, R, S, E und E' genannt werden. Durch das von Davies et al. (1982) geforderte Sekundärstrukturmodell für Gruppe I-Introns kommen diese Sequenzen so zu liegen, daß P mit Q, R mit S und E mit E' paart. Daß diese Bindungen wirklich von Bedeutung sind, zeigen Davies et al. (1982) an weiteren Beispielen, bei denen durch kompensatorische Basenaustausche an diesen konservierten Sequenzen der Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt wird. Solche kompensatorischen Basenaustausche wurden auch an den Introns 1, 2 und 3 des *cox1*-Gens und dem Intron der LrRNA von *S. cer.* gefunden (siehe auch Bonitz et al., 1980; Dujon, 1980).

Bei Gruppe I-Introns kann man die Sekundärstrukturen meist so falten, daß der 5'-Spleißpunkt des Introns mit vorangehenden Exonsequenzen gepaart werden kann. Eine "internal guide sequence" (IGS), eine Sequenz, die 5'-seitig der E-Sequenz lokalisiert ist und somit relativ nahe am 5'-Ende des Introns liegt, soll nach dem Modell von Davies et al. (1982) mit kurzen Abschnitten der RNA-Sequenzen am Ende des vorangegangenen Exons und am Beginn des folgenden Exons paaren, so daß die IGS als Adaptorstruktur dient, die die zwei Spleißstellen nahe zusammenbringt.

Die meisten Introns der Gruppe I können unter bestimmten Bedingungen in vitro ohne Beteiligung von Proteinen exzisiert werden. Dies wurde zuerst bei dem Intron für die LrRNA aus *Tetrahymena* entdeckt (Kruger et al., 1982). Es folgten Versuche für weitere Vertreter dieser Gruppe I-Introns. Selbstspleißen wurde auch für das *cob*-Intron 1 aus *Neurospora crassa* (N. crassa, Garriga und Lambowitz, 1984) und das Intron der mitochondrialen LrRNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cer.*, Van der Horst und Tabak, 1985) beschrieben. In vitro-Versuche am menschlichen Beta-Globin-Gen

sowie Konstrukten dieses Genes (mit je einem oder zwei Introns) nützen dieses Phänomen des Selbstspleißens aus, um durch künstlich eingebrachte Mutationen zu überprüfen, ob die Genauigkeit des Spleißvorganges erhalten bleibt. (Man geht davon aus, daß alle Mosaikgene des Kerns in der Lage sind, autonomes Spleißen durchzuführen.)

Gruppe II-Vertreter wurden ebenfalls auf Selbstspleißen untersucht. Hier konnte nur für das Intron5 gamma aus dem cox1-Gen aus *S. cer.* (Van der Veen et al., 1986; Peebles et al., 1986), sowie für das Intron 1 aus cob von *S. cer.* (C.Schmelzer, pers. Mitteilung) nachgewiesen werden, daß autokatalytisches Spleißen möglich ist. Diese beiden Introns sind jedoch keine typischen Vertreter der Gruppe II, sondern gehören zu den Gruppe II-"verwandten" Introns (Lang et al., 1985). Diese beiden Introns besitzen nämlich nicht, wie die anderen Gruppe II-Introns hochkonservierte Sequenzen in der zentralen "core"-Struktur. Für die Introns 5gamma aus cox1 und das 1. Intron aus cob wurden alternative homologe Sekundärstrukturen aufgestellt (Schmelzer et al., 1983; Bonitz et al., 1980). So befindet sich zum Beispiel eine für alle Gruppe II-Introns konservierte Sequenz (Position 75-79 und 104-113) bei den beiden erwähnten Introns an anderer Position, und zwar ungefähr 400-500b in 3'-Richtung versetzt (Lang et al., 1985).

Für Gruppe II-Introns konnten auch einige Gemeinsamkeiten gefunden werden; so ist bei ihnen eine Faltung von Exon- und Intronsequenzen am 5'-Ende des Introns grundsätzlich nicht möglich. Die Sequenzen im Zentrum des Moleküls sind sehr stark konserviert, ebenso die Sekundärstruktur, während die Strukturen in der Peripherie stark voneinander abweichen. Blöcke von Konsensussequenzen liegen bei Gruppe II-Introns nicht derart konserviert vor wie bei Gruppe I; dafür kann man eine relativ starke Homologie der 3'-Enden beobachten. Etwa 80-100 Nukleotide vor dem 3'-Ende gibt es Sequenzen, die zu einem Palindrom gefaltet werden können,

das eine nicht gepaarte konservierte Sequenz GAAA besitzt. Nach Michel et al. (1982) treten Gruppe II-Intron-RNAs immer in zirkulärer Form auf. Während es bei den Gruppe I-Introns zwei Vertreter ohne offenen Leserahmen gibt (*S. cer.*, *cob*-Intron5; *N. crassa*, *cob*-Intron1; Michel und Dujon, 1983), besitzen die beiden der Gruppe II assoziierten Vertreter, ebenso wie das *cox1*-Intron und die beiden nukleären Gene aus *Zea mays* als Vertreter der Gruppe II-Introns keinen offenen Leserahmen. Somit bleiben für Gruppe II-Introns noch vier Vertreter mit offenem Leserahmen: Intron1 und 2 des *cox1*-Genes aus *S. cer.*, das Intron des *cox1*-Genes aus *Podospora anserina* (*P. anserina*) und das einzige Intron des *cob*-Genes aus *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*). Unter diesen vier Vertretern der Leserahmenhaltigen Gruppe II-Introns befinden sich funktionell sehr interessante Spezies; zum einen sind dies das Intron aus dem *cox1*-Gen aus *Podospora*, das durch sein Herausschneiden und Auftreten als Plasmid und dessen Integration ins Kerngenom oder an neue Stellen des mitochondrialen Genomes Seneszenz bei *Podospora* bewirkt (Osiewacz und Esser, 1984). Hier liegt es nahe, eine Parallele zu Transposons zu ziehen, deren Beweglichkeit vielleicht auf einem ähnlichen Mechanismus beruht.

Die folgende Arbeit soll die Reifung der Präkursor-RNA des *cob*-Gens von *S. pombe* Stamm 50 und mitochondrialen Deletionsmutanten zum reifen Transkript untersuchen. Das Intron dieses Gens ist besonders interessant, da es zur Gruppe II von Introns gehört; diese Gruppe enthält, verglichen mit denen der Gruppe I, relativ wenige Vertreter. Es gibt in dieser Gruppe noch drei andere Introns, die auch einen offenen Leserahmen besitzen; es sind dies, wie schon erwähnt, Intron 1 und 2 des *cox1*-Genes aus *S. cer.* und das erste Intron des *cox1*-Genes aus *P. anserina*. Hinsichtlich der Reifung der *cox1*-Prä-mRNA aus *S. cer.* gibt es starke Hinweise auf die Herstellung einer Maturase, die vom Intronleserahmen kodiert wird; bei *Podospora* geht man davon aus, daß die Intronsequenz für ein Enzym mit reverser Transkriptaseaktivität kodiert.

Diese Arbeit soll den Mechanismus der RNA-Reifung für das Cytochrom b-Gen aus *S. pombe* klären, das ein Leserahmenhaltiges Intron der Gruppe II enthält.

Die Untersuchungen wurden dadurch erleichtert, daß bereits die Nukleotidsequenzen des gesamten Genes wie auch des Introns vorlagen (Lang et al., 1985). Außerdem standen Deletionsmutanten zur Verfügung, deren Deletionen das gesamte Cytochrom b-Gen überstreichen und die relativ homolog über diesen Bereich verteilt sind. Die Deletionsorte dieser Mutanten wurden bereits größtenteils mittels Sequenzanalyse basengenau bestimmt (Ahne, 1985). Der Funktionsausfall dieser Mutanten, deren Deletionen von 40-800 bp reicht, d.h. ihre Unfähigkeit, die Intron-RNA aus der Präkursor-RNA herauszuschneiden oder die Exonanteile zu ligieren, können Hinweise auf Domänen in diesem Intron liefern.

Zunächst sollen bereits bekannte Daten über das mitochondriale Genom von *S. pombe*, Stamm 50, dargestellt werden.

Das ringförmige mitochondriale Genom von *S. pombe* 50 hat eine Länge von 19,43 kb und wurde vollständig sequenziert (Lang et al., 1983; Lang et al., 1985; Trinkl et al., in Vorber., B. F. Lang, unveröffentlichte Ergebnisse). Hier sind die Gene für die große und kleine ribosomale RNA (rRNA), für 25 tRNAs, für ATPase-Untereinheit 6, 8 und 9, Cytochromoxidase-Untereinheit 1, 2 und 3 (cox1, 2 und 3), Cytochrom b (cob) und für einen Leserahmen bisher nicht bekannter Funktion (URFa) lokalisiert (Lang et al., 1983; Abb. 1).

Die Lokalisierung und Identifizierung der Gene wurde durch interspezifische Hybridisierung mit DNA-Proben aus *S. cer.* vorgenommen (Lang und Wolf, 1984). Diese Ergebnisse wurden später durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Ein Gen, das dem bei *S. cer.* gefundenen vari-Gen ähnlich oder homolog ist, ist nicht im mt Genom von *S. pombe* kodiert.

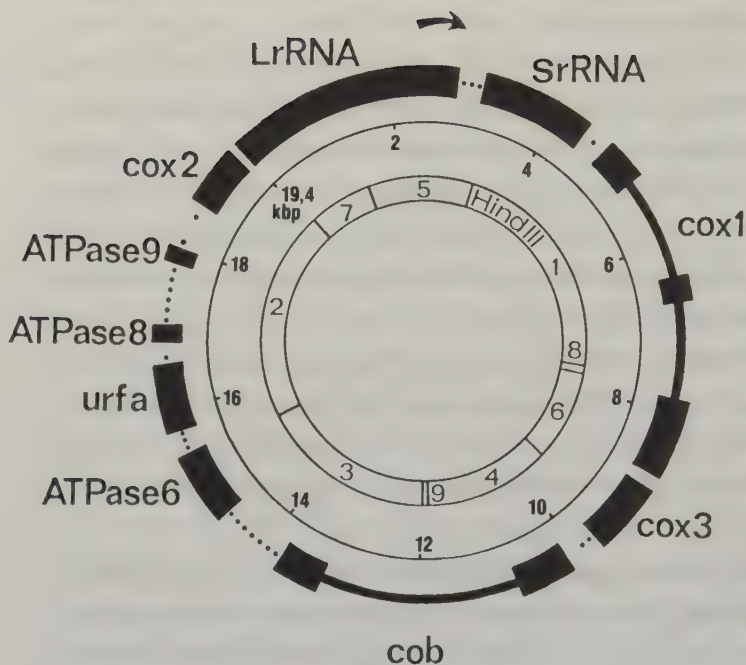


Abb. 1: Das mitochondriale Genom der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*, Stamm 50

Der äußere Kreis gibt die Lokalisation der Gene an.
 Abkürzungen: L (S) rRNA = große (kleine) ribosomale RNA;
 cox1, 2, 3 = Cytochromoxidase-Untereinheit 1, 2, 3; ATPase
 6, 8, 9 = ATPase-Untereinheiten 6, 8, 9; cob = Apocytochrom
 b; urf a = Leserahmen mit unbekannter Funktion.
 Der Pfeil gibt die Transkriptionsrichtung an; der innere
 Kreis zeigt die Schnittstellen des Restriktionsenzym
 HindIII.

Die Numerierung beginnt am 5'-Ende der LrRNA. Auf diese
 Numerierung wird in der Arbeit Bezug genommen.

Trotz der Kürze dieses mt Genoms liegen zwei proteinkodierende Gene als Mosaikgene vor: Das *cox1*- und das *cob*-Gen. Die beiden Introns des *cox1*-Gens gehören der Gruppe I an, nach der von Dujon und Mitarbeitern eingeführten Einteilung der Introns (Michel et al., 1982; Michel und Dujon, 1983). Beide *cox1*-Introns besitzen einen offenen Leserahmen, der in Phase zum vorangegangenen Exon verläuft.

Das *cob*-Gen besitzt nur ein Intron (Gruppe II): Exon 1 hat eine Länge von 670 bp, Exon 2 von 480 bp. S1-Nuklease-Experimente zeigten die Existenz einer Leadersequenz von ungefähr 180 bp und einer Trailersequenz von ungefähr 150 bp Länge. Das Intron mit einer Gesamtlänge von 2500 bp besitzt einen offenen Leserahmen, der in Phase zum vorangegangenen Exon verläuft. Dieser endet ungefähr 100 bp vor dem 3'-Ende des Introns. Die Existenz dieses offenen Leserahmens in Phase zum ersten Exon läßt Vermutungen über die Herstellung einer Maturase, ähnlich wie bei *S. cer.*, zu (Jacq et al., 1980; Jacq et al., 1984; Guiso et al., 1984).

In Abb. 2 sind die beschriebenen Daten und die wichtigsten Restriktionsstellen des *cob*-Gens dargestellt.

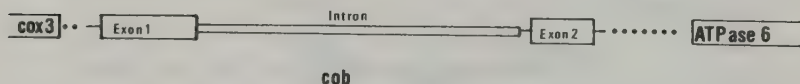
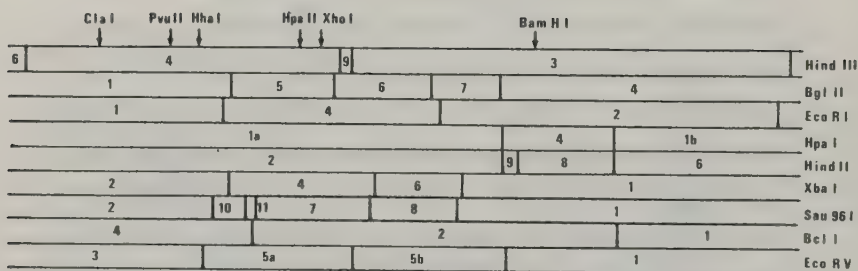


Abb. 2: Restriktionskarte des *cob*-Gens mit angrenzenden Bereichen

Der offene Leserahmen des Introns ist als Balken dargestellt, der blockierte als Strich. Leader und Trailer sind ebenfalls durch Striche gekennzeichnet. Die Punkte entsprechen tRNA-Genen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Abkürzungen

A	Adenosin
ABM	Azobenzylloximethyl
ana ^r	Antimycin-resistent
APT	2-Aminophenylthioether
ATP	Adenosintriphosphat
b(p)	Basen(paare)
C	Cytosin
CsCl	Cäsiumchlorid
diu ^r	Diuron-resistent
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E (1,2)	Exon (1,2)
EB	Ethidiumbromid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EtOH	Ethanol
G	Guanin
I	Intron
Kb(p)	Kilobasen(paare)
(m)M	(milli)molar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mt	mitochondrial
NaAc	Natriumacetat
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NPBC	N-(3 Nitrobenzylloximethyl)- pyrimidiniumchlorid

ORF	offener Leserahmen
PAS	p-Aminosalicylat
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLS	Natriumlaurylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat
SUT	Sucrose-Tris
T	Thymidin
TE	Tris-EDTA
TEB	Tris-EDTA-Borat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethendiamin
TES	Tris-EDTA-Nitrat
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
TPNS	Tri-isopropyl-naphtalin-sulfat
UPM	Umdrehungen pro Minute
URF	offener Leserahmen mit unbekannter Funktion
WT	Wildtyp

1.2. Nomenklatur der Gene

cob	Apocytochrom b
cox1,2,3	Untereinheiten 1,2,3 der Cytochrom c-Oxidase
oli1,2	ATPase-Untereinheit 9,6
LrRNA	große ribosomale RNA
SrRNA	kleine ribosomale RNA
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure

1.3. Feinchemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	BRL, Maryland, USA Seakem, USA
Agfapan 100 Film	Agfa Gevaert, Leverkusen
Ashless-Filterpapier	Schleicher und Schüll, Dassel
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bisbenzimid	Riedel de Haen, Hannover
BSA	Sigma, St. Louis, USA
Cäsiumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Chloramphenicol	Bayer, Leverkusen
Diethyprocarbonat	Fluka AG, Buchs SG, Schweiz
DNA aus Heringssperma	Boehringer Mannheim
Dimethylsulfat	Fluka AG, Buchs SG, Schweiz
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
Ficoll	Sigma, St. Louis, USA
Formamid	Fluka AG, Buchs SG, Schweiz Serva, Heidelberg
Gene Screen	NEN, Dreieich, BRD
Glucose	Hedinger, Stuttgart
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Hydrazin	Eastman Organic Chemicals
Methylquecksilber	Ventron GmbH, Karlsruhe
Natriumnitrit	Baker Chemicals, Deventer, NL
Nitrocellulose	Schleicher und Schüll, Dassel
NPBC	BDH Chemicals, Ltd Poole, GB

Orange G	Sigma, St.Louis, USA
Penicillin	Sigma, St.Louis, USA
Piperidin	Sigma, St.Louis, USA
SDS	Serva, Heidelberg
Spermidin	Sigma, St.Louis, USA
TEMED	Serva, Heidelberg
tRNA aus E.coli	Boehringer, Mannheim
Tris	Sigma, St.Louis, USA

1. 4. Radiochemikalien und Enzyme

Radioisotope	NEN, Dreieich, BRD Amersham-Buchler, Braunschweig
DNA-Polymerase I	BRL, Maryland, USA
Kälberdarmphosphatase	Boehringer, Mannheim
Klenow-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Novozym	Novo Industries, Kopenhagen, DK
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim BRL, Maryland, USA
SP6-Polymerase	Renner, Dannstadt-Schauernheim
reverse Transkriptase	BRL, Maryland, USA
terminale Desoxy- nukleotidyl-Transferase	Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T4-Polynukleotid- Kinase	Boehringer, Mannheim

1.5. Medien und Puffer

Vorkultur- und Kulturmedium

2% Hefeextrakt

3-5% Glucose

1% Ethanol

70 µg/ml Penicillin

Sorbitolpuffer

0,75 M Sorbitol

20mM EDTA

25mM Citrat-Phosphatpuffer, pH 5,6

0,1% Guanidinthiocyanat

Citrat-Phosphatpuffer

25mM K_2HPO_4

25mM KH_2PO_4

mit Zitronensäure auf pH 5,6

Lysegemisch

4% SDS

2% TPNS

1% PAS

8% Butanol-2

7M Harnstoff

Kaliumphosphatpuffer (1M)

1M K_2HPO_4

1M KH_2PO_4

pH 5,8

Natriumacetatpuffer (10x)

14,8g Natriumacetat, wasserfrei

47,6 ml Eisessig

mit H₂O auf 1l

TE-Puffer

10mM Tris

1mM EDTA

pH8

RNA-Gelpuffer (20x)

800mM Tris-HCl

720mM NaH₂PO₄

40mM EDTA

mit HCl auf pH 7,0

RNA-Probenpuffer

97% Formamid, redestilliert

1% Bromphenolblau

1% Xylencyanol

1% Orange G

Aufbewahrungspuffer

50 µg/ml tRNA

0,1% SDS

TE ad 10ml

Vorhybridisierungslösung für Northern-Hybridisierung

50% Formamid, deionisiert

5x SSC

50mM Na-Phosphat

0,2% SDS

20% H₂O

250 µg/µl Heringssperma-DNA

0,4% Denhardts-Lösung

1% Glycin

Hybridisierungslösung für Northern-Hybridisierung

= Vorhybridisierungslösung ohne Glycin

Denhardts-Lösung

0,02% BSA

0,02% Ficoll

0,02% PVP

Waschlösungen für Northern-Hybridisierung

a) 30% deionisiertes Formamid

5x SSC

0,1% SDS

b) 0,5x SSC

0,1% SDS

TEB-Puffer

900mM Tris

25-35mM EDTA

900mM Borsäure

pH 8,3

Restriktionspuffer

60mM NaCl

7mM MgCl₂

10mM Tris

pH 7,4

DNA-Laufpuffer

50% Glycerin

10M Harnstoff

0,5 mg/ml Bromphenolblau

Nicktranslationspuffer

0,5M Tris-HCl, pH 7,2

0,1M MgSO₄

1mM Dithiotreitol

20x SSC

3M NaCl

0,3M Na-Citrat

pH 7,2 mit Zitronensäure

Waschpuffer für Southern-Hybridisierung

0,1% SSC

0,1% SDS

50 µg/ml Heringssperma-DNA

SUT-Puffer (Plasmidpräparation)

25% Sucrose

50mM Tris

pH 8

TES-Puffer (Plasmidpräparation)

50mM Tris

5mM EDTA

50mM NaCl, pH 8

Lysemix

0,2% Triton

100mM EDTA, pH 8

20mM Tris, pH 8

Kinase-Puffer (10x)

0,5M Tris-HCl, pH 7,6

0,1M MgCl₂

50mM Dithiothreitol

1mM Spermidin

1mM EDTA

Quickmix

50mM Glucose

25mM Tris, pH 8

10mM EDTA

Kinase-Koch-Puffer

0,2M Tris-HCl, pH 9,5

10mM Spermidin

1mM EDTA

Blunt-Kinase-Puffer (4x)

0,5M Tris-HCl, pH 7,6

0,1M $MgCl_2$

50mM Dithiotreitol

50% Glycerin

Cordycepinpuffer

140mM Kaliumkakodylat

30mM Tris

0,1mM Dithiotreitol

1mM $CoCl_2$

pH 6,9

Strangtrennungspuffer

96,5% Formamid, deionisiert

0,1% Xylencyanol

0,1% Bromphenolblau

3,3% Methylquecksilber

Hybridisierungspuffer für S1-Nuklease

80% Formamid

0,4M NaCl

0,04M Pipes, pH 6,9

1mM EDTA

Reaktionspuffer für S1-Nuklease

0,25M NaCl

0,03M NaOAc

1mM ZnSO_4

5% Glycerin

Puffer für reverse Transkriptase (10x)

500mM Tris-HCl, pH 7,5

500mM KCl

8mM MgCl_2

Ligasepuffer (10x)

500mM Tris-HCl, pH 7,8

10mM MgCl_2

200mM Dithiothreitol

Transkriptionspuffer (10x)

400mM Tris-HCl, pH 7,5

60mM MgCl_2

in vitro-Spleiß-Puffer (4x)

400mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

40mM MgCl_2

200mM Tris-HCl, pH 7,5

LB-Medium

10% Trypton

0,5% Hefeextrakt

0,05% NaCl

0.0125% NaOH

0,025% Glycerin

Antibiotika-Zugabe für die Anzucht von plasmidhaltigen

E. coli-Stämmen:

120 µg/ml Ampicillin

15 µg/ml Tetracyclin

25 µg /ml Chloramphenicol

1. 6. Stämme und Klone

1. 6. 1. S. pombe-Stämme

ade7-50h⁻

U. Leupold, Bern

Die mitochondrialen Deletionsmutanten stammen von folgenden Stämmen:

ana^r-14: Mutanten EB4, EB5, EB7, EB9, EB11 wurden durch Ethidiumbromidbehandlung abgeleitet, Mutante Sp272 wurde durch spontane Mutation abgeleitet.

ana^r-8: Mutante EB12b wurde durch Behandlung mit Ethidiumbromid, Sp49b durch spontane Mutation abgeleitet.

diu^r-301: Mutanten diu123 und diu145 wurden durch spontane Mutation abgeleitet.

(Ahne et al., 1983)

1. 6. 2. Bakterienstämme

E. coli HB 101 recA⁻, rK⁻, mK⁻ (H.W. Boyer, San Francisco)

1. 6. 3. Plasmidstämme

Siehe Tabelle 2, Ergebnisteil

2. Methoden

2. 1. Anzucht von S. pombe 50 und Mutanten

Die Zellen wurden einen Tag auf Glucose-Platte bei 30°C bebrütet. Danach wurden sie einen Tag in Vorkulturmedium (100–200 ml) geschüttelt. Am Tag darauf wurde das Medium erneuert (doppeltes Volumen) und bis zum nächsten Morgen bebrütet. Dann wurde nochmals das Medium gewechselt und die spätlogarithmischen Zellen noch einmal zu einer Teilung angeregt. Nach 2–4h, wenn die Zellen sich zu etwa 70% in Teilung befanden, wurde mit der Präparation der mt DNA bzw. mt RNA begonnen.

2. 2. Präparation der mt RNA

Die Präparation wurde zunächst nach Lang et al. (1977) durchgeführt. Für die Sphäroplastenbildung wurde Mercaptoethanol (0,1%) und Novozym (100mg/l Kultur) verwendet. Die Mitochondrien wurden über Glyceringradienten (80% und 40% Glycerin) gereinigt und mit Lysegemisch lysiert.

2. 3. Reinigung der mt RNA

Zur Reinigung der mt RNA wurde das Mitochondrienlysate auf einen Cäsiumchlorid-Gradienten geschichtet (1g CsCl auf 1ml TE; Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid und 1 µl Diethylpyrocarnat für insgesamt 6 Zentrifugenröhrchen mit je 2,6 ml Inhalt) und 12–20h bei 40000 UPM (SW 60

Ti-Rotor) bzw. 30000 UPM (SW 40 Ti-Rotor) zentrifugiert. Die erhaltene RNA wurde in 300 µl TE gelöst und mit Phenol und Chloroform ausgeschüttelt. Danach wurde sie mit 2,5 fachem Volumen EtOH und 1/10 Volumen 3M NH₄Ac oder NaAc gefällt.

2. 4. Elektrophoretische Auftrennung der mt RNA auf denaturierenden Gelen

2. 4. 1. Harnstoff-Agarose-Gel

Die Bereitung des Harnstoff-Agarose-Geles erfolgte nach Locker (1979). Ethanolpräzipitierte RNA wurde 15' bei 12000 UPM abzentrifugiert und getrocknet. Die Probe wurde in 10-20 µl Formamid gelöst, das als Farbmarker Bromphenolblau, Xylencyanol und Orange G enthielt. Nach Auftragen der Proben wurde eine Spannung von 100 V angelegt, die nach 20' auf 150 V erhöht wurde. Die Laufzeit betrug 3-4h.

2. 4. 2. Quecksilber-Agarose-Gel

Die Bereitung des Quecksilber-Agarose-Geles erfolgte nach Bailey und Davidson (1976).

2. 4. 3. Glyoxalgel

Die Bereitung der Gele und die Glyoxylierung der RNA-Proben erfolgte nach Thomas (1980).

2. 5. UV-Photographie der Harnstoff- bzw. Quecksilber-Agarose-Gele

Das Gel wurde nach Ablösen von den Glasplatten mit Ethidiumbromid angefärbt (Konzentration: 1,7 mg/l); für Quecksilbergele wurde zur Neutralisation des Methylquecksilbers 0,1% Mercaptoethanol zugegeben. Färbedauer: 15'-40'. Photographiert wurde im Durchlicht mit Agfapan 100-Film.

2. 6. Northern-Hybridisierung

Die RNA wurde vom Gel entweder auf ABM- oder auf APT-Papier transferiert. Die Bereitung des ABM-Papieres erfolgte nach Alwine et al. (1979), die des APT-Papieres nach Maniatis et al. (1982). Glyoxylierte RNA aus Agarosegelen wurde auf Nitrocellulose (Gene Screen) transferiert (Thomas, 1980).

Die DNA-Proben für die Hybridisierung wurden durch Nicktranslation oder Einzelstrangmarkierung radioaktiv markiert.

2. 7. Isolation spezifischer mt RNA-Banden aus Harnstoff-Agarose-Gelen

Die mt RNA-Bande wurde nach dem Gellauf und Anfärbung aus dem Gel ausgeschnitten und in sterile Dialyseschläuche gebracht. Die Isolation der RNA aus dem Gelstück erfolgte in Anlehnung an die von Zassenhaus et al. (1982) beschriebene Methode. Diese wurde dadurch vereinfacht, daß nur ein Elektrophoresepuffer (TEB + 0,05% SDS) im Dialyseschlauch und im Elektrophoresegerät verwendet wurde. Die Elektroelution erfolgte für 45' bei 50 V. Die mt RNA wurde aus dem Dialyseschlauch pipettiert und mit Phenol und Chloroform ausgeschüttelt. Sie wurde mit 2,5 fachem Volumen EtOH und 1/10 Volumen 3M NH_4^- oder Na-acetat gefällt.

2. 8. Präparation von mt DNA

Die Mitochondrien wurden, wie in Punkt 2. 2. beschrieben, präpariert. Zur Lyse wurde nicht Lysegemisch, sondern 10% SLS (oder 10% SDS oder 10% Triton) verwendet. Das Lysat wurde mit Phenol und Chloroform behandelt, um vorhandene Proteine zu eliminieren.

2. 9. Reinigung der mt DNA

Die mt DNA wurde auf einen CsCl-Gradienten aufgebracht (siehe Punkt 2. 3.) und zwei Tage zentrifugiert. Die erhaltene DNA wurde zur weiteren Reinigung über eine DEAE-Säule gegeben.

2. 10. Restriktion der mt DNA bzw. Plasmid-DNA

Die Restriktion erfolgte nach Angabe der Hersteller der Restriktionsendonukleasen.

2. 11. Auftrennung restringierter mt DNA auf Agarosegelen

Zur Überprüfung der geschnittenen mt DNA wurden horizontale 1,5%-Agarose-Harnstoff-Gele angefertigt, die mt DNA in Glycerinpuffer aufgenommen und auf das Gel gebracht. Das Gel wurde nach dem Lauf mit Ethidiumbromid angefärbt. Als Marker wurden je nach Größe der zu überprüfenden DNA mit aufgetrennt:

a) DNA aus dem Phagen P22, geschnitten mit EcoRI.

Man erhält Banden der folgenden Größe (in Kb):

15,86; 9,38; 7,33; 4,08; 2,45; 1,15; 1,11; 0,86.

b) DNA aus dem Plasmid pBR322, geschnitten mit HinfI und HindIII. Man erhält Banden der folgenden Größe (in Kb):

0,517; 0,506; 0,396; 0,344; 0,298; 0,221; 0,220; 0,154; 0,075.

2. 12. Auftrennung restringierter mt DNA auf Acrylamidgelen und Reisolation der mt DNA-Banden

Die Auftrennung der restringierten DNA erfolgte auf 6%igen Acrylamidgelen bei einer Spannung von 300-500 V. Die Proben wurden dafür in Glycerinpuffer aufgenommen und mit Bisbenzimid angefärbt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Reisolation der mt DNA-Banden aus dem Acrylamidgel erfolgte durch Elektroelution in Dialyseschläuchen bei 100 V (Mc Donnel et al., 1977). Die eluierte DNA wurde mit Phenol und Chloroform ausgeschüttelt und mit Ethanol und Natriumacetat gefällt.

2. 13. Alpha-³²-Phosphat-Markierung der mt DNA durch Nicktranslation

Die Methode wurde größtenteils nach Rigby et al. (1977) durchgeführt. DNase-Behandlung erfolgte nicht, da die DNA selbst nicht frei von

Einzelstrangbrüchen ist und die DNA-Polymerase nicht den höchsten Reinheitsgrad besaß, sondern noch Spuren von Exonukleasen enthielt. Die Inkubationsdauer betrug 3h bei 18°C; die nicht eingebauten radioaktiven Triphosphate wurden nicht über eine Säule, sondern durch Ethanolpräzipitation entfernt. Die Triphosphate verbleiben bei dieser Fällung im Überstand.

2. 14. Southerntransfer und Hybridisierung mit heterologen DNA-Proben

Diese Methode wurde nach der Anleitung von Southern (1975) durchgeführt.

2. 15. Plasmidpräparation

2. 15. 1. Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

Die Präparation der Plasmid-DNA für in vitro-Transkription und in vivo-Spleißen erfolgte nach der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode.

2. 15. 2. Plasmidpräparation nach Clewell

Die DNA-Fragmente, die zur Northern-Hybridisierung und für S1-Analysen verwendet wurden, wurden nach Clewell (1972) präpariert.

2. 16. Endmarkierung doppelsträngiger und einzelsträngiger mt DNA

2. 16. 1. Radioaktive Markierung der 5'-Enden doppelsträngiger DNA mit gamma-ATP

Die Markierung wurde nach der Anweisung von Maniatis et al. (1982) durchgeführt. Die Salzkonzentration des Puffers für die Markierung glatter DNA-Enden wurde um das Fünffache erhöht, um eine höhere Einbaurrate zu erzielen.

2. 16. 2. Radioaktive Markierung der 3'-Enden doppelsträngiger DNA mit alpha-ATP

Die Markierung wurde nach der Anweisung von Maniatis et al. (1982) durchgeführt.

2. 16. 3. Radioaktive Markierung der 3'-Enden doppelsträngiger DNA mit Cordycepin

Die Markierung erfolgte nach der Beschreibung von Tu und Cohen (1980).

2. 16. 4. Radioaktive Markierung des 5'-Endes einzelsträngiger DNA mit gamma-ATP

Die Markierung erfolgte wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben.

2. 17. Strangtrennung

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA in Einzelstränge erfolgte durch Inkubation der DNA in Strangtrennungspuffer für 30-45' bei 90°C. Die DNA wurde auf einem Vortex-Schüttler behandelt und auf ein 6%iges Acrylamidgel aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 500 V und 4°C.

2. 18. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der endmarkierten DNA erfolgte nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980). Zusätzlich zu den vier "klassischen" Sequenzreaktionen wurde noch eine A>C Reaktion eingeführt, wodurch ein höheres Auflösungsvermögen im oberen Bereich der Sequenzgele erreicht wurde. Die abgeschlossenen Sequenzreaktionen wurden auf 0,3 mm dicke, 60 cm lange denaturierende Acrylamidgele aufgetragen, die nach Anleitung von Garoff und Ansorge (1981) vorbehandelt wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 2000-3000 V.

2.19. S1-Nuklease-Technik

Zur Bestimmung der 5'- und 3'-Enden der Transkripte wurde S1-Nuklease-Behandlung der DNA/RNA-Hybride nach Bonitz et al. (1982) durchgeführt.

2.20. Primer-Extension mit reverser Transkriptase

Diese Technik wurde, wie bei Tabak et al. (1984) beschrieben, durchgeführt.

2.21. SP6-Klonierung

Klonierung von DNA-Fragmenten in den pSP64- bzw. pSP64-Vektor erfolgte nach Melton et al. (1984).

2.22. In vitro-Transkription

Die in vitro-Transkription des in pSP64 bzw. pSP65 einklonierten DNA-Fragments erfolgte wie bei Tabak et al. (1984) beschrieben.

2.23. In vitro-Spleiß-Reaktion

Diese Reaktion wurde nach zwei verschiedenen Anleitungen durchgeführt. Die zunächst erprobte Methode erfolgte nach Tabak et al. (1984). Außerdem wurde ein anderer Versuchsansatz verwendet (R. Van der Veen, pers. Mitteilung). Hierfür wurde die Reaktion der in vitro-Transkription ohne Spermidin durchgeführt. Der Inkubationsansatz für die in vitro-Spleiß-Reaktion enthielt 4mM Tris, pH 8,3; 5-50mM $MgCl_2$; 2mM Spermidin. Die Inkubation wurde hier 1/2h bei 45°C durchgeführt. Nicht eingebaute radioaktive Triphosphate wurden abweichend von der Anweisung durch Fällung mit EtOH + NaAc (3M) bei -20°C (über Nacht) abgetrennt.

2.24. Transkriptkartierung mit RNase T1 und A ("S1-Typ"-Kartierung)

Diese Methode wurde nach der Beschreibung von Zinn et al. (1983) durchgeführt.

III. ERGEBNISSE

A. Überblick über bisher bekannte Daten der Transkriptreifung in den Mitochondrien von *S. pombe*, Stamm 50

Alle mitochondrialen Gene sind bei *S. pombe* auf einem DNA-Strang kodiert. Daher kann man davon ausgehen, daß im Gegensatz zu der komplexeren Situation bei Säugern (auf dem ungefähr 16,5 Kb langen Genom kodieren beide DNA-Stränge für die mt Gene; Übersicht in: Clayton, 1984) hier ein relativ einfacher Mechanismus der Transkription vorliegt. Bisher deuten Versuche darauf hin, daß es einen Hauptpromotor gibt, der am 5'-Ende der großen ribosomalen RNA (LrRNA) sitzt, von dem aus das gesamte Genom als ein Primärtranskript abgelesen wird (B. F. Lang, pers. Mitteilung). Es gibt Hinweise darauf, daß von einem schwachen Promotor am Beginn des *cox3*-Genes auch Primärtranskripte, jedoch in wesentlich geringerer Konzentration, hergestellt werden (B. F. Lang, pers. Mitteilung).

Da jedes Gen (außer dem LrRNA- und *cox3*-Gen) von einem oder mehreren tRNA-Genen flankiert wird, ist anzunehmen, daß der Herstellung des Primärtranskriptes die Exzision der tRNAs und mRNAs folgt. Diese Annahme wird durch S1-Nuklease-Experimente gestützt. Sie zeigen zum einen, daß die Transkriptreifung der Gene für die ATPase-Untereinheiten 6 und 9 und für die Gene *cox1* und *cox2* durch Schneiden am 3'-Ende der vorangegangenen tRNA erfolgt; zum anderen zeigen die S1-Nuklease-Experimente, daß es Vorläufertranskripte gibt, in denen mRNAs mit voran- oder nachgestellter tRNA-Genen verbunden sind (*cox1*-Gen + 5'-seitige tRNA^{Met} oder ATPase-Untereinheit 6 + 3'-seitige tRNA^{His}; Lang et al., 1983). Da die ribosomalen RNAs in wesentlich höheren Konzentrationen vorliegen als die übrigen Transkripte, ist anzunehmen, daß das C-Cluster am 3'-Ende der SrRNA (neun aufeinanderfolgende Cytosinnukleotide; Trinkl et al., in Vorbereitung) als

Terminationssignal wirken kann. Eine Aufeinanderfolge von C-Resten, jedoch nur eine Anzahl von 4 oder 5, am 3'-Ende proteinkodierender Gene sowie der tRNA^{Ala} werden vermutlich als Erkennungssignal für das Prozessieren der RNA an 3'-Enden verwendet.

Für die Herstellung eines Primärtranskriptes und anschließendes Processing der tRNA- und mRNA-Moleküle spricht weiterhin, daß bei mt Mutanten die ProcessingKinetik stark herabgesetzt ist, so daß eine Anhäufung von größeren Präkursortranskripten entsteht, die bis zu 1/3 der Genomlänge erreichen, und die bei elektrophoretischer Auftrennung der gesamten mt RNA gut sichtbar sind.

Da nun viele allgemeine Daten über die Transkription beim Wildtyp und in mt Deletionsmutanten vorlagen, stellte sich die Frage nach dem Prozessieren der Transkripte der komplexeren Gene, nämlich der beiden Mosaikgene. Das Cytochrom b-Gen bot sich für eine solche Untersuchung an, da es mit einem Intron ein relativ einfaches Mosaikgen darstellt. In diesem Genbereich gibt es eine Anzahl von Mutanten. Die Deletionen, deren Länge zwischen 40 und 800 bp betragen, befinden sich sowohl im Intron als auch in den beiden Exons. Es sollte nachgeprüft werden, inwiefern das Vermögen der Mutanten, bestimmte Transkripte des cob-Gens noch zu synthetisieren, in Zusammenhang mit Deletionsort und -größe steht.

Die Möglichkeiten des Vergleichs mit dem bereits gut untersuchten Cytochrom b-Gen aus *S. cer.* und besonders der für dieses Gen existierenden Mutanten und deren Funktionsausfälle könnten über verschiedene Prozessierungsmechanismen in den verschiedenen Organismen Aufschluß geben.

B. Transkripte im Cytochrom b-Bereich des Stammes 50

1. Transkriptcharakterisierung im Cytochrom b-Bereich

Zunächst wurde die mtRNA auf einem Vertikalgel mit 6 M Harnstoff und 1,5 % Agarose aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die beiden stärksten Transkriptbanden, die im Gel sichtbar wurden, waren von Anziano et al. (1983) und von H. Trinkl et al. (in Vorbereitung) als kleine ribosomale RNA identifiziert worden. Eine ebenfalls relativ starke Bande, die zwischen großer und kleiner ribosomaler RNA sichtbar wurde, stellt eine cytoplasmatische Verunreinigung dar. Dies ergab sich durch Vergleich von mtRNA mit cytoplasmatischer RNA, die beide nebeneinander im Harnstoffgel aufgetrennt wurden (Abb. 3).

Die Transkripte im Cytochrom b-Bereich wurden durch Northern-Analysen identifiziert. Dazu wurde gesamte mtRNA des Stammes 50 auf Quecksilber-Agarose- oder Harnstoff-Agarosegelen aufgetrennt und auf ABM- bzw. APT-Papier gebunden. Hybridisiert wurde mit radioaktiven DNA-Proben, die aus dem Exon- und/oder Intronbereich des Genes stammten. Da das Cytochrom b-Gen bereits als Fragmente in die Plasmide pBR322 bzw. pACYC 184 kloniert worden war (Lang und Wolf, 1984), wurden die DNA-Proben für die Hybridisierung durch Plasmidpräparation und geeignetes Schneiden mit Restriktionsenzymen hergestellt.

Für die Herstellung der DNA-Proben wurden folgende Plasmide verwendet:

pFM 71 (pBR 322 + Sequenzen aus *cox3*-Gen, tRNA^{Arg}, tRNA^{Thr}, *cob*-Exon 1 und 250 bp aus dem *cob*-Intron)

pFM 72 (pBR 322 + 900 bp *cob*-Intronsequenzen)

pFM 52 (pBR 322 + 1300 bp *cob*-Intronsequenzen + ungefähr 120 bp aus *cob*-Exon 2)

pFM 51 (pBR 322 + 350 bp aus *cob*-Exon 2 + tRNA-Cluster)

pFM 141 (pACYC 184 + 1700 bp aus *cob*-Intron)

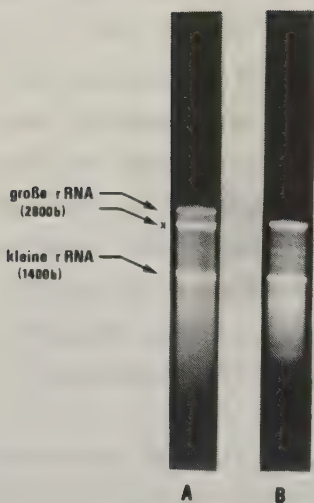


Abb. 3: Vergleich von mtRNA mit cytoplasmatischer RNA aus *S. pombe*

Spur A: gesamte mtRNA

Spur B: cytoplasmatische RNA

Beide Proben wurden auf einem Harnstoff-Agarose-Gel aufgetrennt und mit EB angefarbt. Die mit x gekennzeichnete Bande tritt bei der Präparation von mtRNA stets mit auf.

Durch Restriktion mit geeigneten Restriktionsenzymen wurden Proben erhalten, die entweder nur Exon- oder Intron- oder Exon- und Intronbereiche enthielten, und mit denen bereits eine ungefähre Kartierung der auftretenden Transkripte möglich war.

Tabelle 2 soll die genaue Lage und Größe der für die Hybridisierung verwendeten Plasmide und DNA-Fragmente verdeutlichen. Die Feinrestriktionskarte mit den eingezeichneten DNA-Fragmenten wird in Figur 1 gezeigt.

1.1. Exontranskripte des Cytochrom b-Genes

Durch Hybridisierung mit Exon-Proben (siehe Tabelle 2 und Figur 1), wurde das reife cob-Transkript identifiziert. Da auch DNA-Proben, die bereits vor dem AUG-Startcodon des Cytochrom b-Genes endeten, ein Hybridisierungssignal mit dem reifen cob-Transkript zeigten, muß davon ausgegangen werden, daß das Cytochrom b-Transkript eine Leaderregion aufweist (Details werden später erläutert.).

Die Länge des cob-Transkriptes kann nicht genau festgelegt werden, da mit Northern-Hybridisierungen Transkriptkartierung nur auf 100-200 bp genau möglich ist. Die Exonanteile besitzen laut DNA-Sequenz eine Länge von ungefähr 1300 bp. Da es Hinweise auf die Existenz eines Leaders gibt und vielleicht eine Trailersequenz existiert, wird die Länge des reifen cob-Messengers zunächst mit 1500 b angegeben (Abb. 4).

Das reife cob-Transkript befindet sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung ungefähr in gleicher Höhe wie die Kleine ribosomale RNA.

1.2. Introntranskripte des Cytochrom b-Genes

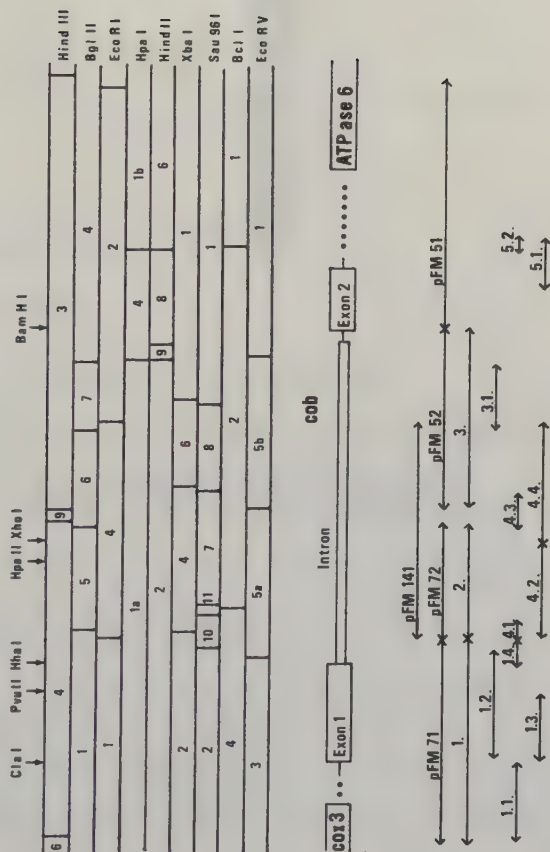
Zur Identifizierung der Introntranskripte des cob-Genes wurde mit DNA-Proben hybridisiert, die entweder nur Intronanteile oder Exon- und Intronanteile enthielten (siehe Tabelle 2 und Figur 1). In der Northern-Hybridisierung wurden zwei Transkriptbanden gleicher Intensität

Name des Plasmids	Vektor	mt-Fragment	Position auf dem mt-Genom	Gesamtlänge (bp)
pFM 141	pACYC 184	EcoRI-4	11051-12745	1694
pFM 71	pBR 322	HII-4/EcoRI	9511-11051	1540
pFM 72	pBR 322	HII-4/EcoRI	11051-11970	919
pFM 52	pBR 322	HII-3/BamHI	12060-13477	1417
pFM 51	pBR 322	HII-3/BamHI	13477-15467	1990
Nr. des DNA-Fragments	DNA-Probe abgeleitet aus	nachgeschritten mit Restriktionsenzym		
1.	pFM 71	-	9511-11051	1540
1.1.	pFM 71	ClaI	9511-10122	611
1.2.	pFM 71	Sau3A	10084-11013	929
1.3.	pFM 71	ClaI, PvuII	9511-10626	1115
1.4.	pFM 71	HinfI	10824-11051	237
2.	pFM 72	-	11051-11970	919
3.	pFM 51	-	13477-15467	1990
3.1.	pFM 51	BglII	12629-13217	598
4.1.	pACYC 184	Sau96I, BglII	11117-11240	123
4.2.	pACYC 184	XhoI	11051-11799	748
4.3.	pACYC 184	Sau96I, BglII	11915-12215	300
4.4.	pACYC 184	XhoI	11799-12745	946
5.1.	pFM 52	DdeI	13627-14141	514
5.2.	pFM 52	Sau3A	14010-14117	107

Tabelle 2: Lage und Größe der für die Hybridisierung der mRNA verwendeten Plasmide und DNA-Fragmente

Figur 1: Feinrestriktionskarte mit Plasmiden und DNA-Fragmenten für die Northern-Hybridisierungen

Die Punkte markieren tRNA-Gene; der offene Leserahmen des Introns ist durch einen Balken dargestellt.



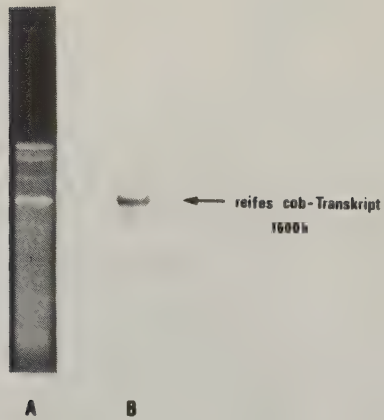


Abb. 4: Hybridisierung von mtRNA mit cob-Exon-DNA

Spur A: Gesamte mtRNA, aufgetrennt auf

Harnstoff-Agarose-Gelen, angefärbt mit EB.

Spur B: Hybridisierte RNA im Autoradiogramm

sichtbar; die kleinere der beiden Banden hatte ungefähr die gleiche Laufgeschwindigkeit wie die cytoplasmatische RNA, die in EB-Anfärbung auf dem Gel zu sehen ist. Dieser kleineren RNA kann eine Länge von etwa 2300 b zugeordnet werden. Das größere Transkript kann der im EB-angefärbten Gel relativ schwach erscheinenden Bande zwischen cytoplasmatischer RNA und LrRNA zugeordnet werden und dürfte nach seinem Laufverhalten im Agarosegel eine Länge von etwa 2500 b besitzen. Die Schätzung der Länge dieser Transkripte scheint realistisch, da die Länge des Introns im cob-Gen 2525 b beträgt (Abb. 5).

2. Transkriptkartierung im Cytochrom b-Bereich

2.1. Reifes cob-Transkript

2.1.1. Transkriptkartierung durch Northern-Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurde eine DNA-Probe verwendet, die vor dem AUG-Startcodon des cob-Genes gelegen war. Mit ihrer Hilfe konnte die Existenz einer Leaderregion bewiesen werden. Eine genaue Aussage über die Länge des Leaders war nicht möglich; durch die verwendete Probe Nr.1.1. (Tabelle 2), die ungefähr 50 bp vor dem AUG-Startcodon endet, wurde deutlich, daß der Leader mindestens 50 bp vor dem Startcodon beginnen muß. Für das 3'-Ende des reifen cob-Transkriptes war wegen der Wahl der DNA-Fragmente, die zur Hybridisierung verwendet wurden, durch Northern-Analysen keine Aussage möglich. Die Existenz einer Trailersequenz wurde durch S1-Analysen, wie später beschrieben, untersucht.

2.1.2. Transkriptkartierung durch S1-Analysen

Eine genauere, wenn auch nicht basengenaue Kartierung der 5'- und 3'-Enden des reifen cob-Transkriptes war durch S1-Analysen möglich. Mit

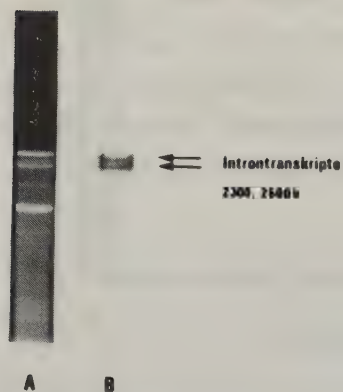


Abb. 5: Hybridisierung mtRNA mit Intron-DNA

Spur A: Gesamte mtRNA, aufgetrennt auf Harnstoff-Agarose-Gel, angefarbt mit EB.

Spur B: Hybridisierte Intron-RNA im Autoradiogramm

Figur 2: Lage und Größe der DNA-Fragmente, die zur Kartierung der Exon-RNA mittels S1-Nuklease verwendet wurden

Länge und genaue Position der Proben:

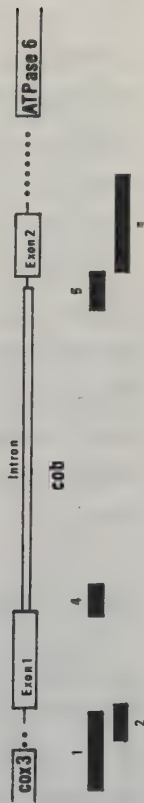
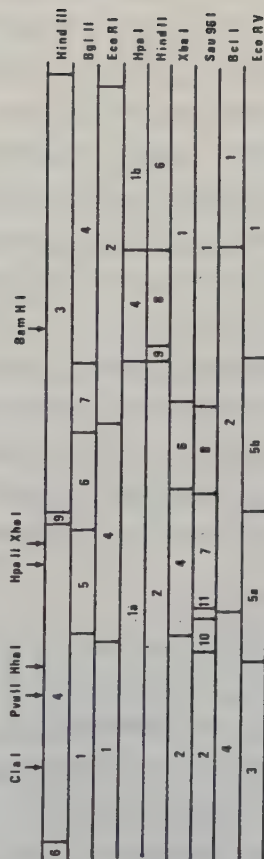
Probe 1: Länge: 611 bp; Pos. 9511-10122 (HindIII-ClaI)

Probe 2: Länge: 317 bp; Pos. 9884-10201 (HinfI-AluI)

Probe 3: Länge: 734 bp; Pos. 13477-14211 (BamHI-TaqI)

Probe 4: Länge: 227 bp; Pos. 10824-11051 (HinfI-EcoRI)

Probe 5: Länge: 240 bp; Pos. 13217-13477 (BglII-BamHI)



dieser Methode wurden der Leaderbeginn, das 5'- und 3'- Ende des 1. Exons, 5'- und 3'- Enden des 2. Exons und die Trailerregion festgelegt. Die gewählten DNA-Fragmente, die zur Hybridisierung mit Gesamt-mtRNA verwendet wurden, hatten eine Länge zwischen 227 bp und 734 bp (Figur 2). Diese waren zur Bestimmung der 5'-Enden der Transkripte als Doppelstränge mit ^{32}P -gamma-ATP, zur Bestimmung der 3'-Enden mit ^{32}P -alpha-ATP oder mit Cordycepin endmarkiert. Die markierten Doppelstränge wurden der Strangtrennung unterworfen. Für die S1-Nuklease-Experimente wurde der Nichtsinnstrang (identifiziert durch Sequenzreaktionen beider Einzelstränge nach Maxam und Gilbert (1980)) mit Gesamt-mt RNA hybridisiert und mit S1-Nuklease verdaut. In manchen Fällen wurden für beide Stränge S1-Experimente gemacht, wobei der Sinnstrang nie S1-Signale aufwies.

Die nach S1-Nukleaseabbau erhaltenen Fragmente wurden auf einem Harnstoff-Acrylamidgel aufgetrennt. Als Referenz diente der gewählte DNA-Einzelstrang, der parallel zu den S1-Experimenten nach Maxam und Gilbert sequenziert und mit auf dem Gel aufgetrennt wurde. So konnten die erhaltenen S1-Signale direkt der dazugehörenden Sequenz zugeordnet werden.

2.1.2.1. Leader

Für die Bestimmung des Leaderbeginnes durch S1-Analyse wurde DNA-Probe Nr. 1 (siehe Figur 2) verwendet. Sie hatte eine Länge von 611 bp und wurde nach Schneiden des in Plasmid pFM 71 einklonierten DNA-Stückes mit dem Restriktionsenzym ClaI erhalten. Sie enthielt nur Leadersequenzen. Das Hybrid aus DNA-Probe und mt RNA war ungefähr 150 bp lang. Der Beginn des Leaders liegt 179-181 b vor dem AUG-Startcodon des cob-Genes. Der Anfangspunkt war nicht basengenau zu lokalisieren, da sich drei gleich starke Signale zeigten. Im Vergleich dazu ist der cob-Leader bei *S. cer.* ungefähr 950 b lang (Bonitz et al., 1982). Dieses mt

Genom ist allerdings mit etwa 80 kb Länge (Bernardi und de Zamaroczy, 1985) auch 3-4 mal länger als das von *S. pombe*, so daß hier genug Raum für Leader- und Trailersequenzen, sowie für andere nicht kodierende Sequenzen vorhanden ist.

Für S1-Experimente mit DNA-Probe 2 (Leaderanteil + Exon 1-Anteil) wurden Signale im Bereich des AUG-Startcodons erhalten. Diese Signale sind von geringerer Intensität als beim Leader. Zunächst wurde diesen Signalen eine Bedeutung im Processing der cob-RNA zugewiesen, was bedeuten würde, daß die Leadersequenz vom übrigen Transkript abgetrennt wird. Nach genauer Prüfung der Nukleotidzusammensetzung in diesem Bereich liegt hier jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit ein S1-Artefakt vor. Man kann nämlich in diesem Bereich sehr gute Faltungsmöglichkeiten der RNA feststellen. Wenn man die Sequenz versuchsweise in Form eines Palindroms faltet, so ergibt sich eine einzelsträngige ungepaarte Sequenz genau an dieser Stelle, wo das S1-Experiment Signale aufweist (Abb. 6). Da dies in einer extrem AT-reichen Region auftritt, so ist die Aussagekräftigkeit dieses S1-Ergebnisses stark zu bezweifeln.

2.1.2.2. Trailer

Die für die S1-Analyse verwendete DNA-Probe war 734 bp lang (Probe Nr. 3, Tabelle 2). Sie erstreckt sich von der BamHI-Restriktionsschnittstelle im Exon 2 bis zur TaqI-Stelle, die sich bereits in der ersten tRNA des anschließenden tRNA-Clusters befindet (tRNA^{Phe}). Diese Probe schließt also alle Sequenzen vom Ende des Cytochrom b-Genes bis zum tRNA-Cluster ein. Die Experimente zeigen, daß das Ende des reifen cob-Transkriptes nicht identisch mit dem Ende des Gens (Stopcodon TAA) ist. Das Transkript ist um 145-157 b länger als das Gen; eine genauere Eingrenzung des Transkriptes war durch S1-Analyse nicht möglich, da sich hier viele S1-Signale zeigten.

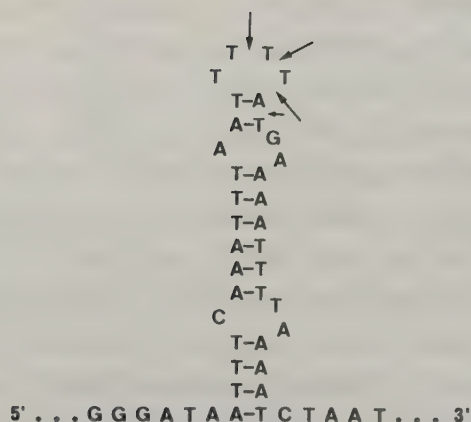


Abb. 6: Faltungsmöglichkeit der RNA im Bereich des AUG-Startkodons

Die Pfeile zeigen die Positionen, an denen S1-Signale auftreten. Die Größe der Pfeile soll die Intensität der S1-Signale darstellen.

Aufgrund des Nachweises von Leader- und Trailersequenzen hat die reife cob-RNA eine Mindestlänge von 1488 b und eine Höchstlänge von 1502 b; die Längenschätzung mit etwa 1500 b, die zu Beginn der Arbeit vorgenommen wurde, erweist sich somit als realistisch und soll auch in weiteren Betrachtungen beibehalten werden.

2.1.2.3. Exon 1/Exon 2-Übergang

Diese Experimente wurden mit den DNA-Proben 4 und 5 durchgeführt (Tabelle 2). Die Proben hatten eine Länge von 227 bp bzw. 260 bp. Probe 4 enthielt Exon 1- und Intronanteile, Probe 5 Intronanteil und Exon2-Sequenzen. Diese Experimente ließen keine basengenaue Aussage über den Exon 1/Exon 2-Übergang im reifen cob-Transkript zu, da sie keine einzeln auftretenden Signale ergaben. Für dieses AT-reiche Genom lassen sich mit S1-Analysen nur ungefähre Aussagen über die Lage und Länge bestimmter Transkripte machen.

2.1.3. Transkriptkartierung durch Primer-Extension

Um eine basengenaue Aussage über den Exon1/Exon 2-Übergang im reifen cob-Transkript zu erhalten, wurde die Methode der Primer-Extension gewählt.

Für die Primer-Extension ist zunächst ein DNA-Einzelstrang als Primer nötig; dieser kann durch Restriktion eines größeren DNA-Stückes und anschließender Strangtrennung gewonnen werden. Diese Primer haben jedoch den Nachteil, daß sie meist nicht rein genug sind, d. h. sie enthalten oft noch andere DNA-Fragmente, die den Versuch dann stören. Daher ist ein synthetisches Oligonukleotid von 15-35 b Länge vorzuziehen. Diese Stücke sind relativ klein und sicherlich unkontaminiert.

Der Primer, der komplementär zum Sinnstrang sein muß, wird mit ^{32}P -gamma-ATP endmarkiert und mit der gewünschten RNA (entweder Gesamt-RNA oder speziell isolierte RNA-Spezies) hybridisiert. Mit

reverser Transkriptase und Desoxynukleotiden ist es nun möglich, diesen Primer zu verlängern, indem die reverse Transkriptase die RNA als Vorlage zur Verlängerung des Primers benützt. Teilt man den Versuchsansatz zur Kettenverlängerung in vier Teile, und gibt man zu jedem dieser Ansätze alternativ eines der vier Didesoxynukleotide, so kann man bereits während der Verlängerung des Primers die Sequenz nach der Kettenabbruchmethode von Sanger erhalten (Sanger et al., 1977). Die Sequenz wird nach Aufbringen der Proben auf ein Harnstoff-Acrylamidgel und Autoradiographie lesbar.

Als Primer für die Bestimmung des Exon 1/Exon 2-Überganges wurde ein künstliches DNA-Oligonukleotid verwendet, das von Dr. H.-J. Fritz aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München/Martinsried zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Oligonukleotid besitzt eine Länge von 31 b und liegt 20 b vom 5'-Ende des 2. Exons entfernt. Durch 5'-Markierung des Oligonukleotides, Hybridisierung mit Gesamt-mtRNA aus *S. pombe* 50 und Verlängerung des Primers mit reverser Transkriptase ergab sich basengenau und eindeutig die Sequenzfolge im reifen Cytochrom b-Gen im Bereich der Verbindungsstelle von Exon 1 und Exon 2 (Abb. 7).

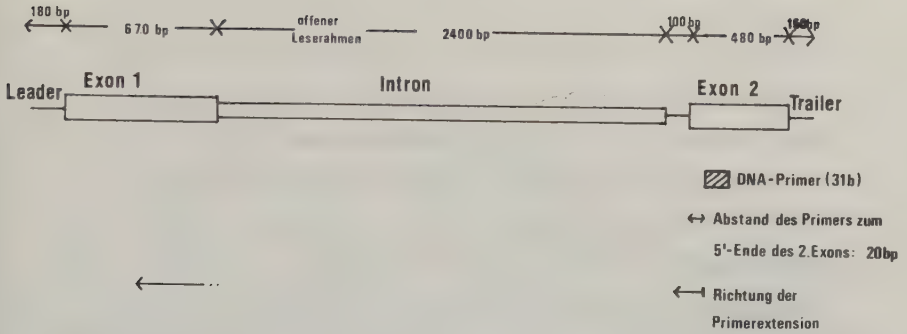
Dieses Experiment bestätigt die durch Vergleich mit anderen Eukaryonten und mit dem intronlosen *S. pombe*-Stamm EFl festgelegten Exon1/Exon2-Grenzen (Trinkl et al., 1984, Lang et al., 1985).

2.2. Introntranskripte

2.2.1. Längenfestlegung durch S1-Analyse und Primer-Extension

Durch S1-Analysen war nur eine ungenaue Aussage über die Lage der 5'- und 3'-Enden der Introntranskripte möglich. Zur basengenauen Festlegung der 5'-Enden der Introntranskripte wurde die Technik der Primer-Extension angewendet. Als Primer diente ein 16 b langes künstliches Oligonukleotid, das von Herrn Prof. Dr. van Boom aus

a)



b)



Abb. 7: Primer-Extension zur Bestimmung des Überganges von Exon1 und Exon 2

a) Lage des Primers

b) Sequenz der cDNA an der Verbindungsstelle von Exon 1 und Exon 2

Leiden/Niederlande zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Oligonukleotid besteht aus Intronsequenzen und liegt 74 b vom 5'-Ende des Introns entfernt (Abb. 8). Die Primer-Extension wurde zum einen mit einem Hybrid aus Primer und großer Intron-RNA (2500 b), zum anderen mit einem Hybrid aus Primer und kleiner Intron-RNA (2300 b) durchgeführt. Dazu wurden die beiden RNA-Spezies aus einem Harnstoff-Agarosegel ausgeschnitten (Laufdauer des Gels zur besseren Trennung der beiden Introntranskripte ungefähr 6-8h) und durch Elektrophorese in Dialyseschläuchen eluiert (siehe Material und Methoden). Der Primer wurde durch reverse Transkriptase in Richtung 5'-Ende des Introns verlängert, indem das Enzym entweder die große oder die kleine Intron-RNA als Vorlage benützte. Die Ergebnisse waren für beide Versuche identisch. Die Sequenz der cDNA lief bis zum 5'-Ende des Introns und wies dort ein starkes Stoppsignal auf (Abb. 9). Ein solches Stoppsignal wird auch bei Primer-Extension anderer Introns gefunden, die als Lariatmolekül vorliegen (siehe Hernandez und Keller, 1983; Hardy et al., 1984; Krainer et al., 1984; Wallace und Edmonds, 1984; Rodriguez et al., 1984; Domdey et al., 1984). Die identischen Ergebnisse für beide Intron-RNAs beweisen gleiche 5'-Enden beider Intronspesies.

Das 3'-Ende der Intron-RNA wurde aufgrund der Ermittlung des Exon1/Exon2-überganges durch Primer-Extension und des erhaltenen Resultates wie folgt festgelegt:

Intron: 5'.....cttagttcaatGATTTG...3'-Exon 2

(Kleinbuchstaben bezeichnen Nukleotide des Introns, Großbuchstaben die des Exons.)

Versuche und Ergebnisse zur Unterscheidung der zwei Introntranskripte sind in Punkt 3. 1. beschrieben.

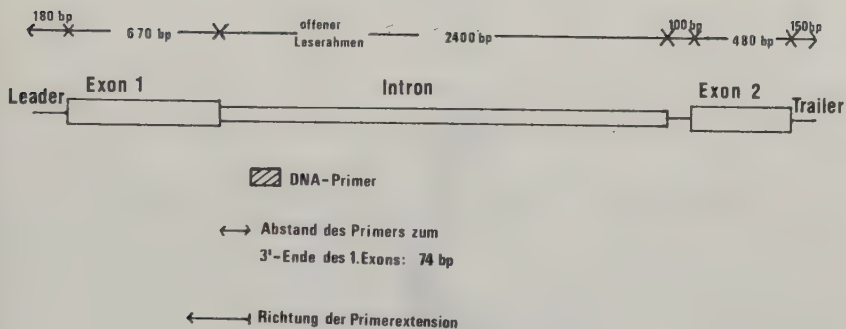


Abb. 8: Lage des Primers zur Untersuchung der 5'-Enden der Introntranskripte

♂ C T A G

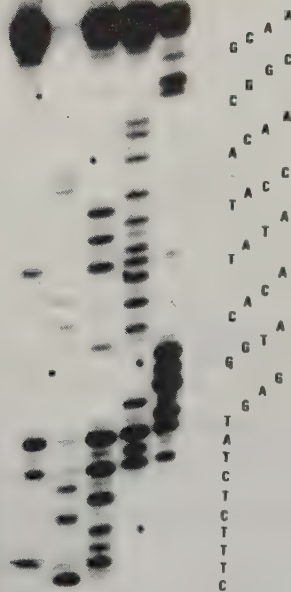


Abb. 9: Primer-Extension zur Bestimmung der 5'-Enden der Intronskripte

a) Originalgel

Spur ♂ : Primer-Extension ohne Didesoxynukleotide. Die hier auftretenden Signale sind Abbrüche der Primer-Extension.

5' TTG CGC CGT TGT GGT ATA TAT GTG TAC CCT CAT AGA GAA AG

Abb. 9: Primer-Extension zur Bestimmung der 5'-Enden der Introntranskripte

b) Sequenz

Die Sequenz wurde komplementär zu der im Originalbild dargestellten geschrieben, da sie die Sequenz des Sinnstranges darstellt und somit auch die Sequenz der RNA.

2.2.2. Auftreten eines Transkriptes aus Intron- und Exonanteilen

Bei der Untersuchung des 5'-Endes von Exon 2 durch S1-Nuklease-Experimente ergaben sich außer Signalen um das 5'-Ende des Exons zusätzliche Signale, die 12 b nach Beginn des geschlossenen Leserahmens des Introns lagen. Diese Signale waren wesentlich stärker als die am 5'-Ende des Exons 2 (Abb. 10). Die Möglichkeit, dieses Ergebnis als Artefakt zu betrachten, ist hier nicht gegeben, da eine interne Faltung der RNA in diesem Sequenzbereich nicht möglich ist.

Für das 3'-Ende dieses neuen Transkriptes können folgende Überlegungen angestellt werden. Das Ende des Transkriptes kann nicht am 3'-Ende des Introns liegen, da dieses mit den durchgeführten S1-Untersuchungen nicht hätte erkannt werden können, da die Markierung der DNA-Probe an der BamHI-Stelle im Exon 2 vorgenommen wurde. Diese Restriktionsselle befindet sich 96 bp vom 5'-Ende des 2. Exons entfernt. Somit muß dieses Transkript eine Mindestlänge von 185 b haben (von seinem 5'-Ende bis zur BamHI-Stelle). Ein Transkript dieser Länge wäre durch Northern-Analysen nicht erkennbar (die Methode der RNA-Isolierung aus Mitochondrien läßt nur die Gewinnung von RNA-Spezies mit einer Länge über 300-400b zu). Falls das Transkript den ganzen Exon2-Bereich einschließen würde, so hätte es eine Länge von ungefähr 600 b. Ein solches Transkript wurde in Northern-Hybridisierungen (d.h. Hybridisierung von RNA, die auf ABM- bzw. APT-Papier gebunden war) mit einer Exon2-DNA-Probe ebenfalls nicht erfaßt.

Ein Transkript mit der Länge 600-700 b wurde jedoch bei der Hybridisierung auf Gene Screen gebundener RNA (die vorher glyoxyliert und auf einem Agarosegel aufgetrennt worden war) entdeckt. Für die Hybridisierung wurde als DNA-Probe ein Oligonukleotid verwendet, das im geschlossenen Leserahmen des Introns lokalisiert ist. Es ist anzunehmen, daß es sich um das hier beschriebene Transkript handelt, da es mit einem Oligonukleotid am 3'-Ende des offenen Leserahmens des Introns nicht

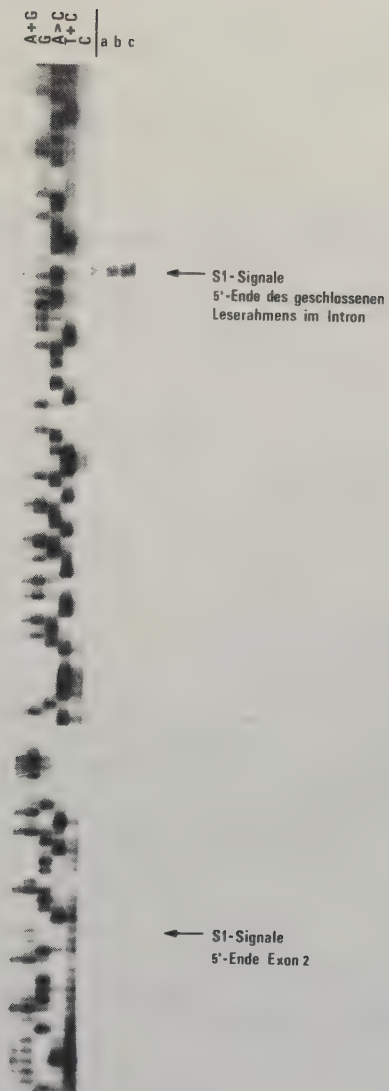


Abb. 10 a

b)



Abb. 10: S1-Experiment zur 5'-Kartierung des Transkriptes mit Intron- und Exon 2-Anteilen

a) Photo

Die Sequenz wurde nach Maxam und Gilbert (1980) erstellt. Zusätzlich zu den vier "Standard-Reaktionen" wurde eine A>C-Reaktion durchgeführt, um ein höheres Auflösungsvermögen im oberen Teil der Gele zu erhalten.

In den Spuren a, b und c wurden die S1-Reaktionen in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, so daß die Probe der Spur a etwa 500, Spur b 1000 und Spur c 1500 CPM Radioaktivität enthielt.

b) Signale in der Sequenz

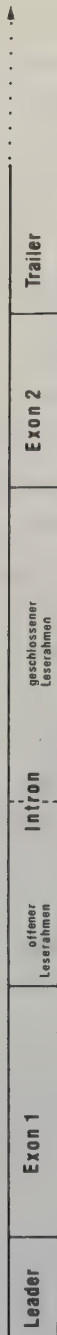
Die kleinen Buchstaben bedeuten Nukleotide im Intron, die großen solche im Exon.

hybridisiert. Das Transkript besteht wahrscheinlich aus den Sequenzen des geschlossenen Leserahmens des Introns und dem gesamten Exon 2, da es eine Länge von 600-700 b aufweist. Die genaue Beschreibung und dazugehörige Abbildung sind in Punkt 3. 1. 6. ausgeführt.

2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Transkriptkartierung im cob-Gen

- Das reife cob-Transkript beinhaltet neben den kodierenden Sequenzen der Cytochrom b-DNA auch Leader- und Trailersequenzen, die ungefähr 180 b bzw. ungefähr 150 b lang sind.
- Der Übergang von Exon 1 nach Exon 2 im reifen cob-Gen nach Herausschneiden des Introns wurde durch Primer-Extension präzise bestimmt.
- Es gibt ein drittes Transkript, dessen 5'-Ende 12 b nach Ende des offenen Leserahmens im Intron liegt und mindestens bis zur BamHI-Stelle im Exon 2 reicht (96 b nach 5'-Ende des Exon 2) und daher eine Mindestlänge von 185 b aufweist. Hybridisierungsversuche deuten darauf hin, daß dieses Transkript alle Sequenzen des 2. Exons enthält. Dieses Transkript erscheint bei Hybridisierung von Gesamt-mtRNA (auf Gene Screen geblottet) mit einem radioaktiven Oligonukleotid aus dem geschlossenen Leserahmen des Introns. Es erscheint nicht, wenn als Hybridisierungsprobe ein Oligonukleotid am 3'-Ende des offenen Leserahmens des Introns verwendet wurde (siehe Punkt 3. 1. 6.).

Diese Daten sind in Abb. 11 illustriert.



CAATCCCTTT ATG AAA ATT CTG ATA AAA ttg cgc cgt gtt tag atacttaaatgtagt gtccaat GAT TTC ... CGA TAA TCTCTT ATCTAATTAATG



reife cob-m RNA (1500 b)

Intron-RNA (2500 b)

Intron-RNA (2300 b)

RNA mit Intron- und Exon 2 - Anteilen

Abb. 11: Zusammenfassung der Ergebnisse der Transkriptkartierung für Exon- und Intron-Transkripte

Das Gen in dieser Abbildung ist nicht maßstabsgetreu dargestellt.

3. Untersuchungen der Natur der Introntranskripte Stamm 50

3. 1. Unterscheidung der beiden Intron-RNA-Spezies

3. 1. 1. Southern-Hybridisierung

Es wurde überprüft, ob es sich bei dem einen der beiden in Northern-Hybridisierungen mit Intron-DNA erhaltenen Transkripte um eine Kreuzhybridisierung einer homologen RNA-Spezies handelt, oder ob auf dem mitochondrialen Genom eine Duplikation dieser Intronsequenz vorliegt. Hierfür wurde gesamte mtDNA einmal mit HincII, zum anderen mit EcoRI geschnitten, auf einem waagrechten Harnstoff-Agarosegel aufgetrennt und Southern-Hybridisierung mit nicktranslatierter Intron-DNA durchgeführt. In beiden Hybridisierungen wurde für den Fall des einmaligen Vorkommens der Intronsequenz auf dem Genom das Auftreten einer Bande erwartet. Das Ergebnis dieses Versuches lieferte den Beweis, daß auf dem mt Genom keine zum cob-Intron homologe Sequenz existiert, d.h. die cob-Intronsequenz ist einmalig auf dem Genom. Dieses Ergebnis wurde später durch die Sequenz der gesamten mt DNA bestätigt (B.F. Lang, pers. Mitteilung). Die beiden Transkripte, die bei Northern-Hybridisierung erhalten werden, stammen also aus dem Intronbereich des cob-Genes.

3. 1. 2. Ist das 2300 b-Transkript eine Verkürzung des 2500 b-Transkriptes?

Diese Fragestellung wurde zunächst mit Northern-Hybridisierung angegangen. Dafür wurden zwei spezifische DNA-Fragmente zur Hybridisierung mit gesamter mt RNA gewählt (Abb. 12).

Probe A war nahe dem 5'-Ende der Intronsequenz lokalisiert. Ihre Länge betrug 121 bp und wurde durch Restriktion mit den Enzymen HhaI (5'-seitig) und Sau96-1 (3'-seitig) hergestellt. Das 5'-HhaI-Ende der Probe liegt 4 bp vom 5'-Ende des Introns entfernt. Mit dieser Probe sollte eine eventuelle

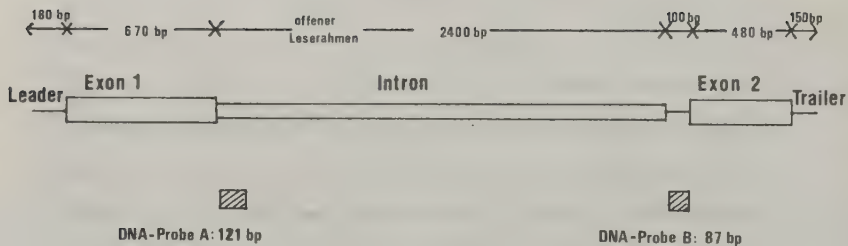


Abb. 12: Lokalisierung der beiden DNA-Fragmente, die für die Northern-Hybridisierung hergestellt wurden

Verkürzung des einen Introntranskriptes am 5'-Ende des Introns festgestellt werden.

Probe B war nahe dem 3'-Ende der Intronsequenz lokalisiert. Ihre Länge betrug 87 bp und wurde durch Restriktion mit den Enzymen EcoRV (5'-seitig) und DdeI (3'-seitig) hergestellt. Das 3'-DdeI-Ende der Probe hat zum Beginn des 2. Exons einen Abstand von 10 bp.

Eine mögliche Längendifferenz der beiden Introntranskripte würde 100-200 b betragen; somit müßte diese Versuchsanordnung zur Identifizierung möglicher Unterschiede dieser Moleküle beitragen. Im Falle einer Verkürzung des einen Transkriptes dürfte entweder mit Probe A oder mit Probe B nur das größere der beiden RNA-Moleküle hybridisieren.

In beiden Hybridisierungen (mit Probe A und B!) traten beide Introntranskripte auf, was einen ersten Hinweis auf die Identität der 5'- und 3'-Enden liefert (Abb. 13).

Primer-Extension-Versuche zur genauen Bestimmung der 5'-Enden der beiden Introntranskripte, wie sie in Punkt 2. 2. 1. beschrieben wurden, bestätigten das durch Northern-Hybridisierung erhaltene Ergebnis, daß die 5'-Enden beider Intron-RNA-Moleküle identisch sind.

Hiermit wurde bewiesen, daß der Unterschied der beiden Introntranskripte nicht in verschiedenen Molekülflanken begründet ist. Untersuchungen weiterer Möglichkeiten für das Auftreten zweier verschiedener Moleküle im Intronbereich, wie zum Beispiel verschiedene Konformation oder die Existenz eines "Introns im Intron" (d.h. daß in der Mitte des Introntranskriptes eine Sequenz herausgeschnitten würde), werden in den folgenden Punkten behandelt.

3. 1. 3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Durch Betrachten der Transkripte im Elektronenmikroskop sollte die Konformation der beiden Intron-RNA-Moleküle untersucht werden. Die beiden RNA-Spezies wurden gelelektrophoretisch voneinander getrennt,

2 Intron-
Transkripte $\Rightarrow$  2600b
2300b

Probe A Probe B

Abb. 13: Northern-Hybridisierung von mtRNA mit Proben A und B

Lokalisierung der DNA-Proben siehe Abb. 12.

aus dem Gel ausgeschnitten und durch weitere Elektrophorese im Dialyseschlauch isoliert. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser beiden Moleküle führte Frau Dr. A. Arnberg in Groningen/Niederlande aus. Sie stellte fest, daß beide Moleküle in der gleichen Konformation, nämlich in zirkulärer Form vorliegen (Abb. 14).

Hybridisierung beider Intron-RNAs mit DNA aus pFM 141 (siehe Tabelle 2), die Intronsequenzen bis auf 299 bp am 5'-Ende und 550 bp am 3'-Ende des Introns enthält, ergab im elektronenmikroskopischen Bild die Struktur, die für zirkuläre RNA nach Hybridisierung mit linearer DNA zu erwarten war; d.h. man sieht ein zirkuläres Molekül, das an der hybridisierten Stelle dicker erscheint.

Frau Dr. Arnbergs Längenschätzungen, die sie aufgrund der Ausmessung der Moleküle im elektronenmikroskopischen Bild und der bekannten Länge der hybridisierten DNA ausführte, ergaben für die größere RNA eine Länge von 2758 ± 121 b, für die kleinere RNA 2529 ± 176 b. Diese Längenschätzungen differieren gegenüber denen in dieser Arbeit vorgenommenen Längenvergleichen mit verschiedenen RNA-Molekülen um jeweils 200 b. Frau Dr. Arnberg erklärt diese Differenz damit, daß die bei ihrer Längenschätzung vorgenommene Umrechnung von μ m in Nukleotide ungenau ist, da die Länge doppelsträngiger DNA im Elektronenmikroskop nicht der gleichen RNA-Länge entspricht. Die Umrechnung ist korrekt für den hybridisierten Teil (DNA/RNA), nicht jedoch für den einzelsträngigen nicht gepaarten RNA-Anteil und bietet so nur einen ungefähren Anhaltspunkt für die Länge des Moleküles.

Die Messungen ergaben, daß die hybridisierten Anteile beider RNA-Moleküle etwa identische Länge hatten und keine loop-ähnlichen Strukturen in der gepaarten Region sichtbar waren. Das bedeutet, daß beide Moleküle im hybridisierten Bereich identisch sind.

Weiterhin hybridisierte Frau Dr. Arnberg beide Intron-RNA-Moleküle mit einer DNA-Probe (Probe 3, Tabelle 2), die Intron- und Exon2-Sequenzen

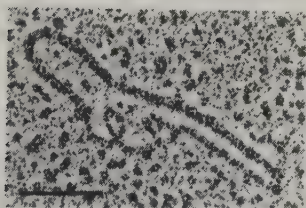
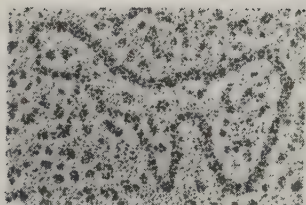


Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme der beiden
Intron-RNA-Spezies

Die Aufnahmen wurden von Frau Dr. Arnberg zur Verfügung
gestellt. (———— - 0,1 μ m)

enthielt (ungefähr 1400 bp Intronsequenz bis zum 3'-Ende des Introns und ungefähr 100 bp Exon2-Sequenz).

Sie stellte fest, daß nach Hybridisierung etwa gleich viele Moleküle mit und ohne Schwanzteil (= Exon-DNA, die nicht hybridisiert hatte) im Elektronenmikroskop sichtbar waren. Längenschätzungen ergaben, daß der Schwanzteil eine Länge von 130 ± 24 bp besitzt, was mit dem Exonanteil der DNA-Probe von ungefähr 100 bp gut übereinstimmt.

Frau Dr. Annberg kommt aufgrund ihrer Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß ein Unterschied der beiden Intron-RNA-Moleküle im 3'-Ende liegen muß, und daß es möglich sein könnte, daß die Moleküle in Lariatform vorliegen. Diese Ergebnisse gehen konform mit den Primer-Extension-Versuchen zur Bestimmung der 5'-Enden der beiden Intron-RNA-Molekülen. Die Ergebnisse hierfür zeigten, daß die 5'-Enden beider Moleküle identisch sind und offensichtlich an der Bildung einer Verzweigungsstelle für ein Lariatmolekül beteiligt sind, was das starke Stoppsignal des Primer-Extension-Versuches für beide Moleküle erklärt. Das würde bedeuten, daß die Verschiedenheit der Moleküle weniger an den Randsequenzen der Introns, sondern innerhalb der RNAs zu suchen ist.

3.1.4. Gibt es ein "Intron im Intron"?

Der Unterschied der beiden Intron-Transkripte könnte, wenn nicht in der Verkürzung der Enden der Moleküle, so vielleicht im Herausschneiden einer Sequenz innerhalb des Moleküls begründet sein. Es würde sich dann bei dieser Sequenz um ein "Intron im Intron" handeln. Dieses Herausschneiden könnte den Sinn haben, daß die neu entstehenden RNA-Moleküle (entweder der herausgeschnittene Teil von 100-200 b, der somit eine ähnliche Länge hätte wie das Gen für ATPase8 aus *S. pombe*, das 144 bp lang ist (Lang et al., 1983), oder die verbleibenden ligierten Molekülanteile, oder beide) eine

neue Funktion übernehmen, z.B. Hilfe beim Processing der Exon-RNA-Anteile o.ä. .

Zur Lösung dieser Frage wurde das SP6-Klonierungssystem benutzt. Die Intron-DNA-Sequenz mit angrenzenden Exonanteilen wurde entgegen der Leserichtung des Gens in den SP6-Vektor einkloniert, so daß in vitro eine zu den Introntranskripten komplementäre RNA transkribiert werden konnte. Hybride aus dieser reversen RNA mit je einem der beiden natürlich vorkommenden Introntranskripte wurden mit RNasen T1 und A behandelt. Diese Enzyme erkennen Einzelstrang-RNA-Sequenzen und greifen dort an. Ein Ausloopen einer RNA-Sequenz im Hybrid würde man in einem Gel durch Auftreten mehrerer kleinerer RNA Banden erkennen, da RNasen T1 und A diese Einzelstrangbereiche erkennen und abbauen würden. Zunächst soll der verwendete Versuchsansatz im Detail beschrieben werden.

3.1.4.1. SP6-Klonierung und in vitro-Transkription

Zur Klonierung der Intron-DNA mit angrenzenden Exonanteilen wurde das Plasmid pSP64 verwendet (Melton et al., 1984). Dieses Plasmid zeichnet sich wie alle SP6-Plasmide durch den Besitz eines sehr starken Promotors aus, der aus dem SP6-Bakteriophagen von Salmonella typhimurium (Stamm LT2) stammt (Butler et al., 1982, Kassavetis et al., 1982). Diesem Promotor folgt in einem Abstand von 5 bp eine Polylinkerregion (wie sie auch in M13-Klonierungsvektoren zu finden ist (Messing und Vieira, 1982; Messing, 1983)), welche die Restriktionsschnittstellen von elf verschiedenen Endonukleasen enthält. Diese sind einmalig auf dem gesamten Vektor und können dazu benützt werden, das gewünschte Genstück hier, nahe am Promotor, einzubauen. Das Plasmid pSP65, das in späteren Versuchen Anwendung gefunden hat, unterscheidet sich von pSP64 durch Inversion der Polylinkerregion. Hier beträgt der Abstand vom Promotor zur Polylinkerregion 9 bp (Abb. 15 zeigt beide Vektoren pSP64 und pSP65).

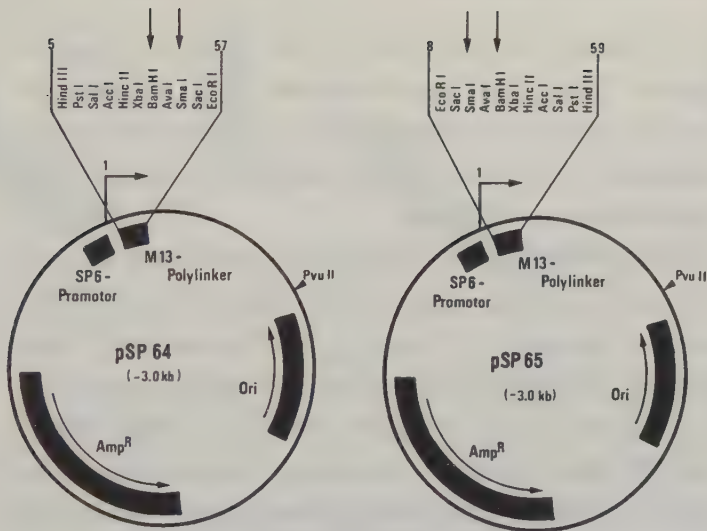


Abb. 15: Vektoren pSP64 und pSP65 (nach Melton et al., 1984)

Nummer 1 bezeichnet das erste Nukleotid nach dem SP6-Promotor;
 die Pfeile markieren die Restriktionsschnittstellen, an denen die Vektoren für die Klonierung linearisiert wurden;
 Ori = Replikationsursprung
 Amp^R = Gen für Ampicillinresistenz

Diese Konstruktion liegt auf einem Multicopy-pUC-Plasmid (pUC12, Vieira und Messing, 1982); unter Standardwuchsbedingungen treten eine hohe Anzahl von Rekombinantenplasmiden auf. Der Vektor enthält außerdem ein Gen für Ampicillinresistenz, so daß eine Selektion auf plasmidhaltige Transformanten erfolgen kann.

Für die Klonierung des DNA-Stückes, von dem später die reverse RNA hergestellt werden sollte, wurde Plasmid pSP64 an der Polylinkerregion durch Restriktion mit Endonuklease BamHI linearisiert und mit SmaI nachgeschnitten. Das lineare Plasmid besaß nun ein kohäsives Ende (BamHI) und ein glattes Ende (SmaI).

Das einzuklonierende DNA-Stück sollte neben den Sequenzen für das Intron auch Teile der angrenzenden Exons enthalten. Daher wurde gesamte mtDNA mit BamHI (schneidet im 2. Exon) und PvuII (schneidet im 1. Exon) restringiert. Man erhielt durch diese Restriktion zwei DNA-Stücke, eines mit 16 Kb, und ein zweites mit ungefähr 3000 bp Länge. Dieses 3000 bp lange DNA-Stück enthielt die gewünschten Intron- und Exon-Sequenzen und wurde für die Ligation mit dem Vektor verwendet. Auch dieses DNA-Stück enthielt ein kohäsives (BamHI) und ein glattes Ende (PvuII), so daß die Ligation in den Vektor nur in einer Richtung erfolgen konnte, indem sich die kohäsiven Enden miteinander und ebenso die glatten Enden miteinander verbanden. Die Orientierung des ligierten Stückes war somit erzwungen. Die cob-Exon 2-Sequenzen schlossen direkt an die BamHI-Stelle des Polylinkers an, gefolgt von Intron- und Exon 1-Sequenzen. Somit war gewährleistet, daß bei in vitro-Transkriptionsversuchen der Antisinnstrang der DNA abgelesen wurde und eine reverse RNA synthetisiert werden konnte. Abb. 16 zeigt die Konstruktion des Vektors pSP64-24, der cob-Intron- und Exon-DNA-Sequenzen enthält, Abb. 17 zeigt das einklonierte DNA-Stück im Detail.

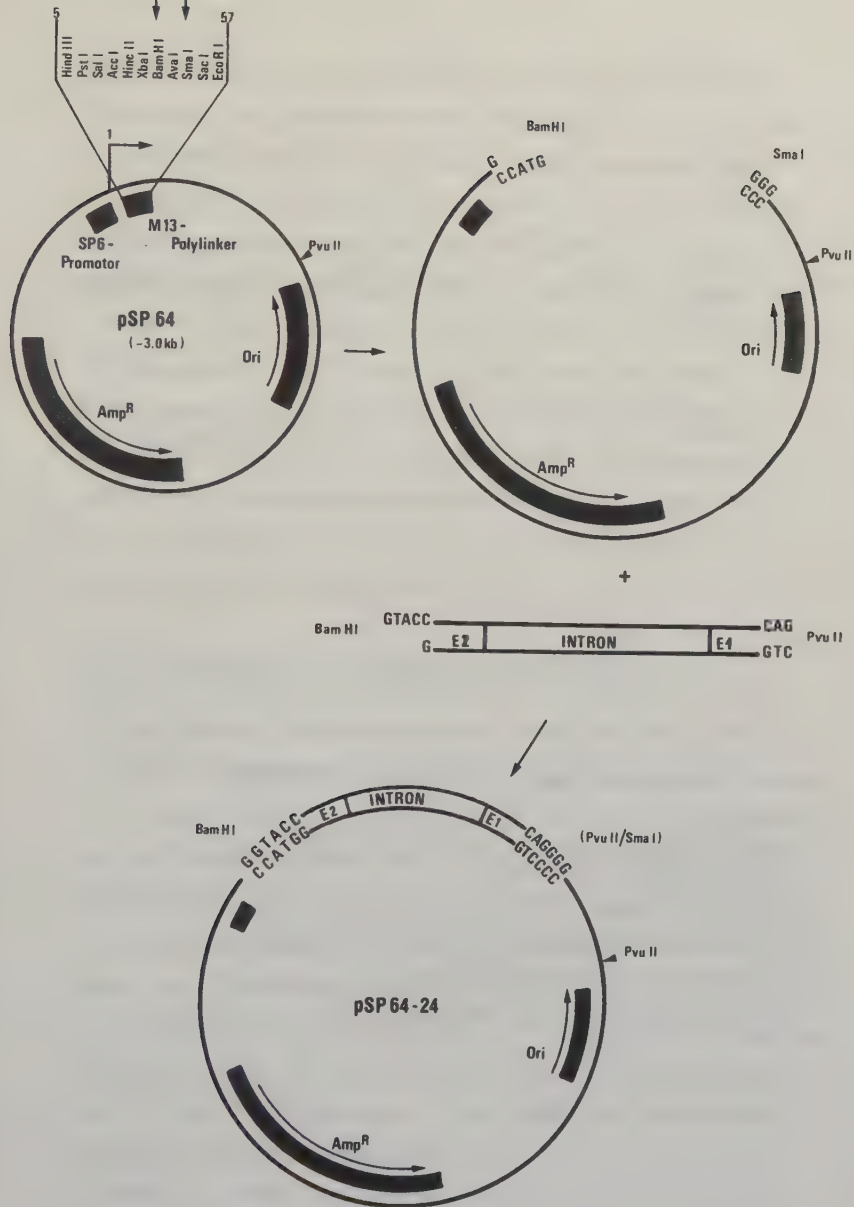


Abb. 16: Konstruktion des Vektors pSP64-24

Die Pfeile markieren die Restriktionsschnittstellen, an denen linearisiert wurde.

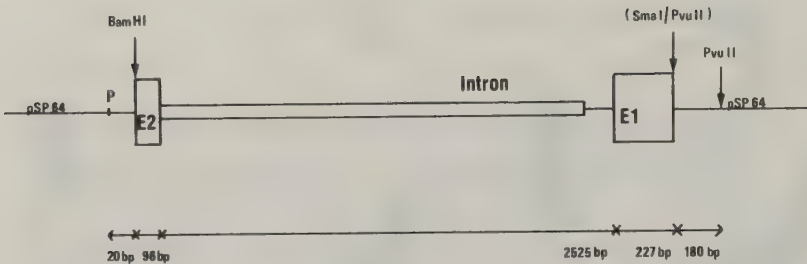


Abb. 17: Einkloniertes DNA-Stück für Vektor pSP64 im Detail

P = Promotor

(SmaI/PvuII) = Durch die Ligation wurde sowohl die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen SmaI als auch PvuII zerstört.

Die Transkription beginnt am Promotor und endet an der PvuII-Restriktionsstelle, an der der Vektor linearisiert wurde. Die in vitro transkribierte RNA enthält somit außer den einklonierten Sequenzen noch Sequenzen des pSP64-Vektors. Es sind dies 20 b vom Promotor bis zur BamHI-Schnittstelle und 180 b vom Ende der E1-Sequenz bis zur PvuII-Schnittstelle.

Nach der Ligation wurde der Stamm E. coli HB 101 mit diesem Plasmid transformiert und Transformanten auf Ampicillinplatten identifiziert. Durch Minipräparationen der DNA einiger Transformanten wurde überprüft, ob die in den Transformanten aufgenommenen Plasmide auch das gewünschte Insert trugen. Das erhaltene Plasmid pSP64-24 wurde mit PvuII (180 bp nach Exon 1-Ende) geschnitten. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde mit SP6-Polymerase, Ribonukleotiden und radioaktivem ^{32}P -alpha-UTP in vitro transkribiert; die Transkription startete am SP6-Promotor und endete an der PvuII-Schnittstelle; das komplette Intron-RNA-Molekül (= cRNA) enthielt außer Intronsequenzen die Sequenzen vom Promotor bis zum Exon 2 (ungefähr 20 b), die Exon 1- bzw. Exon2-Anteilsequenzen und Sequenzen bis zur PvuII-Restriktionsstelle. Die Gesamtlänge dieser cRNA beträgt 3050 b.

3.1.4.2. RNA-Kartierung mit RNase T1 und A ("S1 Typ"-Kartierung)

Die durch in vitro-Transkription erhaltene cRNA wurde mit dem 2500 b- bzw. 2300 b- Introntranskript hybridisiert. Falls das kleinere RNA-Molekül durch Verlust von Sequenzen innerhalb der RNA entstanden ist, so würde bei der Hybridisierung eine längere, einzelsträngige Sequenz aus dem RNA/cRNA Doppelstrang ungepaart bleiben, da diese Sequenz zwar in der cRNA, nicht aber in der 2300 b-RNA vorhanden wäre. Diese einzelsträngige Sequenz (wie natürlich auch die einzelsträngigen Sequenzen vor und hinter dem Intron, d.h. Exon 1- und Exon 2-Sequenzen) würde von RNasen T1 und A erkannt und abgedaut werden. Als Konsequenz davon würden zwei doppelsträngige RNA-Hybridmoleküle übrig bleiben, die, auf einem Gel aufgetrennt, leicht zu erkennen wären.

Im Falle des 2500 b-Transkriptes wäre zu erwarten, daß nach Hybridisierung mit cRNA und Behandlung mit den RNasen nur die einzelsträngigen Flanken (Exon 1- und Exon 2-Sequenzen) abgedaut würden und ein einziges doppelsträngiges Molekül mit einer Länge von ungefähr

2525 b auftreten würde, das man im Gel als eine Bande erkennen könnte, die im Gegensatz zur gesamten in vitro transkribierten RNA um 523 b verkürzt wäre.

Diese Hypothese konnte durch die Versuchsergebnisse nicht gestützt werden. Für beide Hybride, 2500 b-RNA/cRNA und 2300 b-RNA/cRNA zeigte sich im Gel genau eine Bande, die in beiden Fällen die gleiche Größe besitzt. Diese Bande ist im Vergleich zum in vitro hergestellten Ausgangstranskript um ungefähr 500 b verkürzt. Sie stellt das geschützte Hybrid aus Intronsequenzen dar.

3. 1. 5. Spezifische Hybridisierungen der mt RNA mit verschiedenen Oligonukleotiden

Zusätzlich zu den beiden Primern, die am 5'-Ende des Introns (I), bzw. am 5'-Ende des Exons 2 (E) gelegen sind, wurden noch drei weitere Oligonukleotide hergestellt, die im Intron lokalisiert sind. Diese wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Domdey aus dem Genzentrum, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

Diese drei Oligonukleotide waren an folgenden Stellen im Intron lokalisiert (siehe auch Abb.18):

Oligonukleotid 1 ist am 3'-Ende des Introns, im geschlossenen Leserahmen lokalisiert. Die letzte Base des Oligonukleotids entspricht auch der letzten Base des Introns (Länge: 25b).

Oligonukleotid 2 befindet sich am 3'-Ende des offenen Leserahmens des Introns; die letzte Base des Oligonukleotids entspricht der letzten Base des offenen Leserahmens (Länge: 25b).

Oligonukleotid 3: Dies ist ein Konstrukt aus 10b des 5'-Endes des Introns und 10b des 3'-Endes des Introns. Mit dieser Probe soll nachgewiesen werden, ob die Introntranskripte, wie im Elektronenmikroskop beobachtet, Zirkel ausbilden oder ob es sich bei ihnen, wie Primer-Extension-Experimente nahelegen, um Lariatmoleküle handelt. Ein

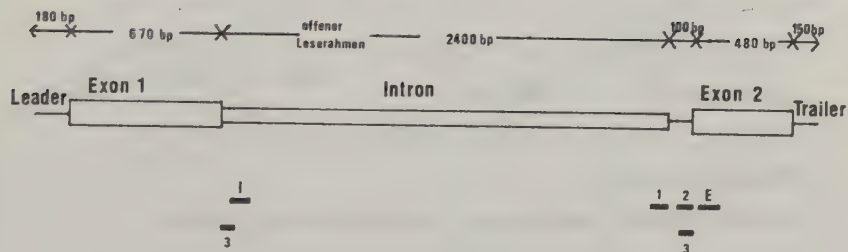


Abb. 18: Lokalisation der für die Hybridisierung verwendeten Oligonukleotide

Die Längen der Oligonukleotide betragen:

- Oligonukleotid 1: 25 b
- " 2: 25 b
- " 3: 20 b
- " I: 16 b
- " E: 31 b

Zirkel würde einwandfrei mit dieser DNA hybridisieren, während bei einem Lariatmolekül bei den gewählten Bedingungen (Temperatur, Salzkonzentration) keine Hybridisierung möglich ist.

Ziel der Hybridisierungsversuche war es zum einen, herauszufinden, ob die Verschiedenheit der zwei Introntranskripte im offenen oder geschlossenen Leserahmen des Introns lokalisiert ist. Zum anderen würde man durch Hybridisierung mit der Exonprobe erwarten, daß außer der reifen cob-RNA eine zusätzliche Bande hybridisiert, die die RNA aus Intron- und Exonanteilen darstellt (und die mit S1-Experimenten nachgewiesen wurde). Zum dritten soll Oligonukleotid 3 klären, ob die zwei Introntranskripte von 2500b und 2300b Lariatmoleküle sind.

Abb. 19 zeigt die Hybridisierungsergebnisse für die 5 Oligonukleotidproben.

Aus den Hybridisierungen lassen sich folgende Ergebnisse entnehmen:

Hybridisierung mit Oligonukleotid 1: Beide Introntranskripte hybridisieren. Im Gegensatz zu allen bisherigen Hybridisierungen liegen hier die Transkripte in unterschiedlicher Konzentration vor. Das Signal für das größere der beiden Transkripte ist nur etwa $\frac{1}{3}$ so stark wie das 2300b-Signal. Dies legt nahe, daß das kleinere der beiden Transkripte möglicherweise doch aus dem größeren hervorgeht.

Ein drittes Signal, das dem Transkript aus Intron- und Exon 2- Anteilen entsprechen könnte, konnte in den Northern-Analysen nicht entdeckt werden (siehe dann auch Punkt 3. 1. 6., wo glyoxylierte mtRNA auf Gene Screen geblottet und mit Oligonukleotiden 1 und 2 hybridisiert wurde).

Hybridisierung mit Oligonukleotid 2: Sie liefert das gleiche Ergebnis wie die Hybridisierung mit Oligonukleotid 1. Auch hier sind die Konzentrationen der beiden Introntranskripte unterschiedlich.

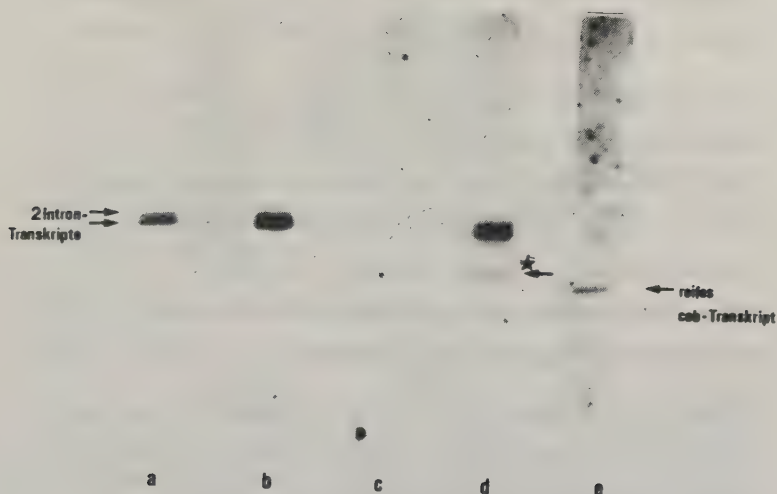


Abb. 19: Northern-Hybridisierung mit Oligonukleotiden

Spur a): Hybridisierung mit Oligonukleotid 1; Spur b): mit Oligonukleotid 2; Spur c): mit Oligonukleotid 3; Spur d): mit Oligonukleotid 1; Spur e): mit Oligonukleotid E. Gesamte mRNA wurde auf einem Harnstoff-Agarose-Gel aufgetrennt und auf APT-Papier geblottet. Bande ★ : zusätzlich auftretendes Transkript, das wahrscheinlich eine Kreuzhybridisierung darstellt. In Spur c) tritt kein Signal auf.

Hybridisierung mit Oligonukleotid 3: Hier zeigte sich auch bei wesentlich längerer Exponierung des Röntgenfilms (verglichen mit den anderen Hybridisierungen) kein Signal. Dieser Versuch beweist, daß beide Introntranskripte in Lariatform vorliegen. Ein möglicher Unterschied dieser beiden Introntranskripte könnte sein, daß sie verschiedene Lariatstrukturen ausbilden, d.h. daß sie verschiedene Verzweigungspunkte besitzen.

Hybridisierung mit Oligonukleotid 1: Sie zeigt ebenfalls zwei Introntranskripte, von denen das kleinere in höherer Konzentration vorliegt als das größere. Außerdem zeigt sich hier ein sehr schwaches Signal, das größer als das reife cob-Transkript ist. Es ist möglich, daß eine Kreuzhybridisierung mit einem Transkript stattfindet, das ähnliche Sequenzen wie das verwendete Oligonukleotid besitzt und durch seine Homologie eine schwache Hybridisierung hervorruft.

Hybridisierung mit Oligonukleotid E: Hier hybridisiert nur das reife cob-Transkript. Eine Bande, die dem nicht genau identifizierten Transkript mit Intron- und Exonanteilen entspricht, tritt nicht in Erscheinung.

Die Hybridisierung mit den fünf Oligonukleotiden konnte nicht dazu beitragen, einen Unterschied der beiden Introntranskripte (2500b, 2300b) festzustellen. Sie lieferte zum einen das Ergebnis, daß das nicht identifizierte Transkript mit Intron- und Exon2-Anteilen mit Oligonukleotidproben 1 und E nicht hybridisiert (siehe dazu nächsten Punkt, 3. 1. 6.). Zum anderen lieferte die Hybridisierung mit Oligonukleotid 3 den Nachweis, daß beide Introntranskripte in Lariatform vorliegen. Da keine Verkürzung bei einem der beiden Moleküle vorliegt, besteht die Möglichkeit, daß diese beiden Lariats einen unterschiedlichen Verzweigungspunkt besitzen.

3. 1. 6. Überprüfung der beiden Introntranskripte auf verschiedene Sekundärstrukturausbildung des gleichen Moleküls

Die Glyoxylierung gesamter mtRNA und Auftrennung auf einem Agarosegel soll dazu beitragen, zu klären, ob die beiden Introntranskripte (2500b, 2300b) verschiedene Sekundärstrukturen eines identischen Moleküls ausbilden. Glyoxylierte RNA ist weit besser denaturiert als mit Formamid behandelte, die auf Harnstoff-Agarose-Gelen aufgetrennt wird. Daher ist zu erwarten, daß nach Denaturierung mit Glyoxal identische Moleküle mit unterschiedlichen Sekundärstrukturen identisches Laufverhalten im Gel zeigen. Nach Hybridisierung mit Intron-DNA (Oligonukleotide) wird dann nur noch ein Signal erwartet.

Zur Überprüfung auf unterschiedliche Sekundärstrukturen des gleichen RNA-Moleküls wurde gesamte mtRNA nach Glyoxylierung auf einem 1,2% igen Agarosegel aufgetrennt. Diese RNA wurde auf Gene Screen-Papier transferiert und einmal mit DNA-Oligonukleotid 1 (im geschlossenen Leserahmen des Introns), zum anderen mit Oligonukleotid 2 (3'-Ende des offenen Leserahmens im Intron; zur genauen Lokalisierung der Oligonukleotide siehe Abb. 18) hybridisiert. Das Autoradiogramm zeigt in beiden Fällen wieder die zwei Banden, wie sie auch bei Hybridisierung von mtRNA, die auf ABM-oder APT-Papier gebunden war, zu sehen gewesen waren (Abb. 20).

Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß es sich bei den beiden Introntranskripten nicht um eine verschiedene Sekundärstrukturausbildung ein und desselben Moleküls handelt.

Im Gegensatz zur Hybridisierung mit Oligonukleotid 2 zeigt Hybridisierung mit Oligonukleotid 1 eine weitere Bande, die eine Länge von 600-700b aufweist. Es ist anzunehmen, daß diese Bande das bisher nicht genau identifizierte Transkript aus Intron- und Exon2-Anteilen darstellt, das

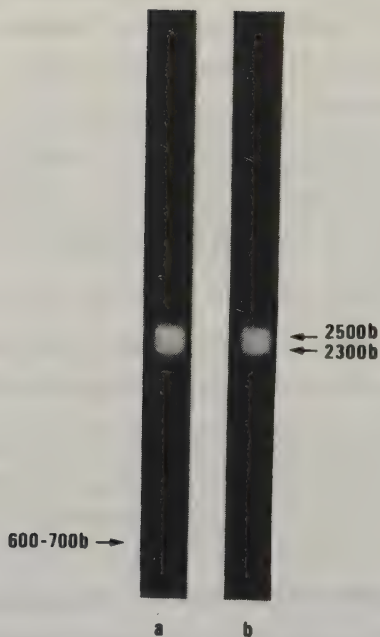


Abb. 20: Hybridisierung glyoxylierter und auf Gene Screen gebundener mRNA mit Oligonukleotiden

Spur a: Hybridisierung mit Oligonukleotid 2

Spur b: Hybridisierung mit Oligonukleotid 1

In Spur a tritt ein drittes Transkript von etwa 600-700 b Länge auf.

auch mit S1-Nuklease-Versuchen entdeckt und dessen 5'-Ende zu Beginn des geschlossenen Leserahmens des Introns kartiert wurde. Die Annahme wird dadurch gestützt, daß diese Bande mit 600-700b Länge nicht mit Oligonukleotid 2 hybridisiert. Die Länge mit 600-700b (Längenschätzung aufgrund gleicher Laufgeschwindigkeit wie Bluemarkers) würde gut mit der Annahme übereinstimmen, daß dieses Transkript aus Sequenzen des geschlossenen Leserahmens des Introns und Exon2 (+Trailer?) besteht. Es bleibt die Frage offen, warum dieses Transkript nicht bei auf ABM- oder APT-Papier gebundener RNA nach Hybridisierung mit dem Oligonukleotid erscheint. Eine Möglichkeit ist, daß dieses Transkript in Harnstoff-Agarose-Gelen (bzw. in Quecksilber-Agarose-Gelen) anderes Laufverhalten besitzt und z.B. gleiches Laufverhalten wie eines der beiden Introntranskripte besitzt. Somit könnte man dieses Transkript nicht erfassen.

3. 2. Untersuchung auf Selbstspießen des Gruppe II-Introns aus dem Cytochrom b-Gen

Seit bekannt geworden ist, daß es bei Tetrahymena ein Intron in der großen rRNA gibt, das unter besonderen Bedingungen in vitro ohne Einwirken eines Proteins auf RNA-Ebene herausgeschnitten werden kann (Cech et al., 1981; Krüger et al., 1982; Zaug et al., 1983), wurden viele Untersuchungen in dieser Richtung auch bei anderen Organismen vorgenommen. So wurden noch einige andere selbstspießende Introns entdeckt, wie z.B. das Intron aus der großen rRNA aus *S. cerevisiae* (Van der Horst und Tabak, 1985), das Intron aus einem künstlich hergestellten menschlichen Beta-Globin RNA-Präkursor, der die ersten beiden Exons und die Intronsequenz enthält (Ruskin et al., 1984) und Intron 1 des Cytochrom b-Gens bei *N. crassa* (Garriga und Lambowitz, 1984). Die untersuchten Introns gehören, wie auch das Tetrahymena-Intron, zur Gruppe I der von Michel und Dujon

eingeführten Klassifizierung von Introns an (Michel et al., 1982; Michel und Dujon, 1983).

Für Gruppe II-Introns, die kleinere und nicht so gut untersuchte der beiden Gruppen, wurde bisher nur für das Intron 5 gamma des *cox1*-Gens bei *S. cer.* (Van der Veen, et al., 1986; Peebles et al., 1986) und Intron 1 aus dem *cob*-Gen von *S. cer.* (Schmelzer und Schweyen, Manuskript eingereicht) untersucht. Wie schon erwähnt, wurden beide Introns von Lang et al. (1985) als Gruppe II-verwandte Introns klassifiziert und stellen somit keine typischen Vertreter dieser Intronklasse dar. Für diese Introns konnte gezeigt werden, daß auch hier die Exzision eines Introns ohne Beteiligung von Proteinen möglich ist. Da das aufgetretene Phänomen offensichtlich doch nicht eine spezifische Eigenschaft der Gruppe I-Introns ist, wurde auch das Cytochrom b-Intron aus *S. pombe* auf Selbstspießen untersucht.

3.2.1. SP6-Klonierung

Zunächst wurde das Intron des Cytochrom b-Gens mit angrenzenden Exonanteilen in den Vektor pSP65 ligiert. Wie schon erwähnt, unterscheiden sich die beiden Vektoren pSP64 und pSP65 nur dadurch, daß die Polylinkerregion in entgegengesetzter Richtung vorliegt. Der Vektor und die mt DNA wurden mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten wie auch bei dem Versuch mit pSP64 (d.h. Vektor pSP65 wurde mit BamHI und SmaI geschnitten, gesamte mt DNA mit PvuII und BamHI). Da die Polylinkerregion in pSP65 entgegengesetzt zu pSP64 vorliegt, wird das Gen bei dieser Ligation in "Leserichtung" eingebaut, so daß bei in vitro-Transkription der "Lesestrang" transkribiert werden kann. Abb. 21 zeigt die Konstruktion des Vektors pSP65-24 mit *cob*-Intron-DNA und angrenzenden Exon-Flanken, Abb. 22 das einklonierte DNA-Stück im Detail.

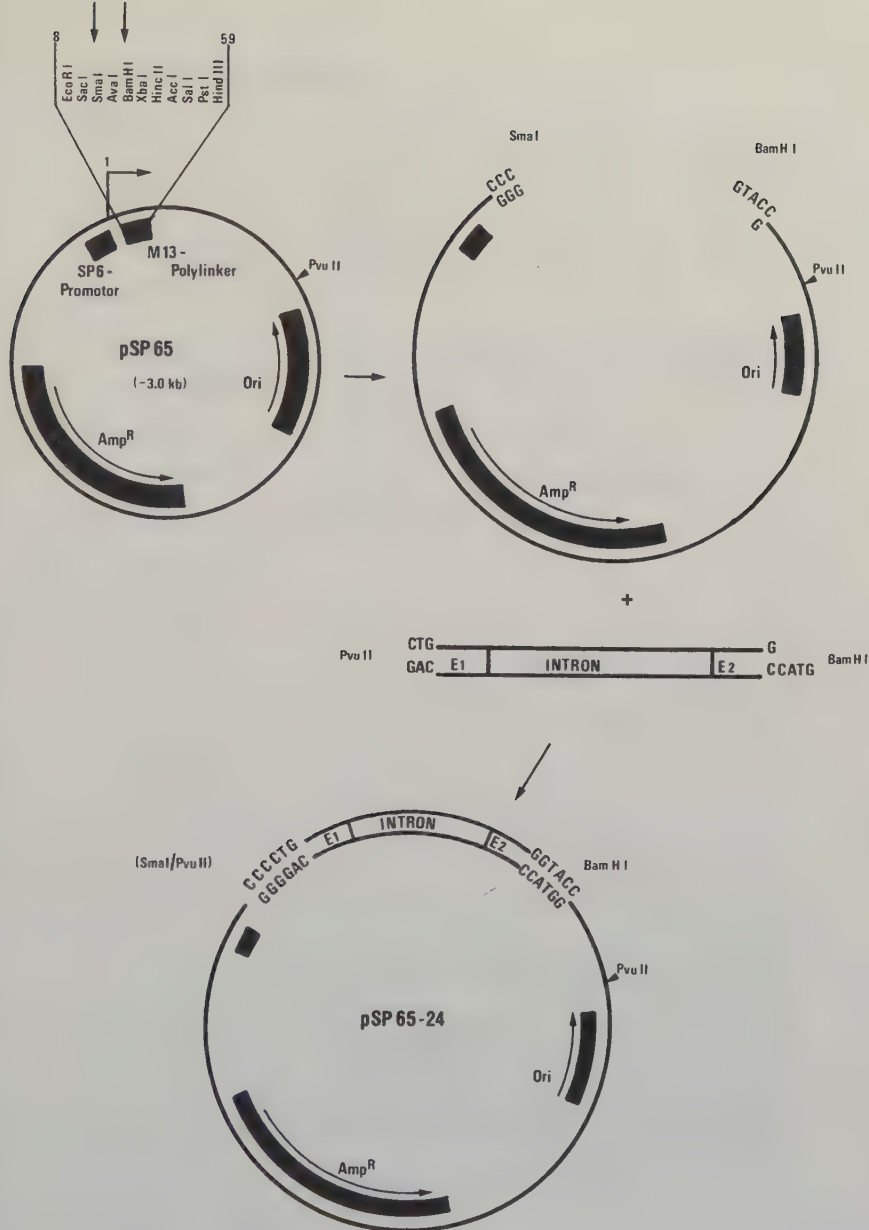


Abb. 21: Konstruktion des Vektors pSP65-24

Die Pfeile markieren die Restriktionsschnittstellen, an denen linearisiert wurde.

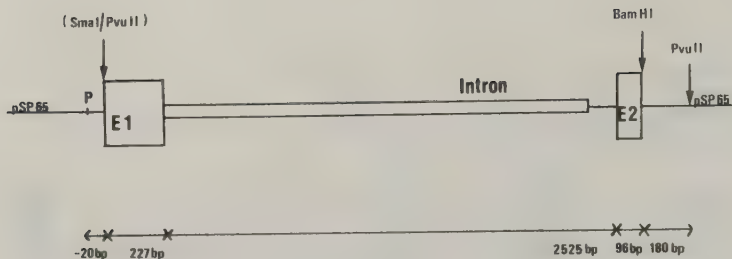


Abb. 22: Einkloniertes DNA-Stück für Vektor pSP65 im Detail

P = Promotor

(SmaI/PvuII): Durch die Ligation wurde sowohl die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease SmaI als auch für PvuII zerstört.

Die Transkription beginnt am Promotor P und endet an der BamHI- oder PvuII-Stelle, je nachdem, wo linearisiert wurde. Die in vitro transkribierte RNA enthält somit außer den cob-Sequenzen noch etwa 20 b vom Promotor bis zur Exon 1-Sequenz; falls mit PvuII linearisiert wurde, enthält das entsprechende Transkript noch etwa 180 b von der BamHI- bis zur PvuII-Restriktionsstelle.

3.2.2. In vitro-Transkription

Für die in vitro-Transkription wurde Vektor pSP65-24 a) mit PvuII, b) mit BamHI linearisiert. Das erhaltene in vitro-Transkript ist im Falle a) 3048b, im Falle b) 2868b lang.

3.2.3. In vitro-Spleißen

Der Versuch des in vitro-Spleißens wurde nach den zwei beschriebenen Methoden (siehe Material und Methoden) durchgeführt. In der folgenden Abbildung (Abb. 23) sind die Transkripte dargestellt, die man bei in vitro-Spleißen für das cob-Gen erwarten würde (die Transkripte sind für verschiedene Linearisierungsstellen verschieden lang, da der Vektoranteil verschieden lang ist).

Im Acrylamidgel sieht man in beiden in vitro-Spleißversuchen (pSP65-24/PvuII und pSP65/BamHI) einige niedermolekulare Banden, die jedoch im Größenvergleich identisch sind (Abb. 24). Bei diesen niedermolekularen Banden könnte es sich theoretisch um das Exon1/Exon2-Ligationsprodukt handeln, das noch Sequenzen des Vektors enthält. Die Länge dieses Transkriptes muß jedoch für verschiedene Linearisierungsstellen variieren, da je nach Linearisierungsstelle der Anteil an vektorialen Sequenzen variiert. Da aber in dem hier beschriebenen Fall diese Banden in ihrer Größe konstant bleiben, muß man davon ausgehen, daß es sich hier um unspezifisch entstandene Banden handelt und nicht das Ligationsprodukt aus Exon1 und Exon2 darstellen. Solche unspezifischen RNA-Moleküle entstehen, wenn die in vitro-Transkription innerhalb der zu transkribierenden Sequenzen abbricht, weil die Sequenz z. B. Ähnlichkeit mit einem Terminationssignal der Transkription aufweist.

Das Cytochrom b-Intron aus *S. pombe* 50 zeigt unter den beiden beschriebenen Bedingungen kein in vitro-Selbstspleißen und verhält sich demnach nicht wie die Gruppe II-verwandten Introns.

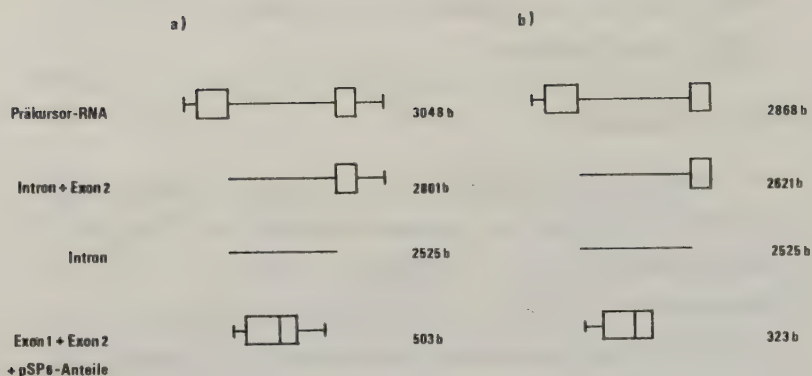


Abb. 23: Zu erwartende Transkripte im Falle des Selbstspleißens

a) Linearisierung des Plasmids pSP65-24 mit PvuII

b) Linearisierung des Plasmids pSP64-24 mit BamHI

Das größere der beiden Kästchen stellt Exon 1, das kleinere Exon 2 dar.

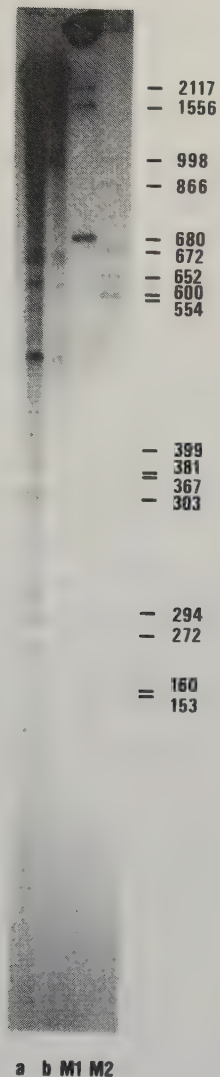


Abb. 24

Abb. 24: in vitro-Spleißversuch für das cob-Intron

Spur a: in vitro transkribierte RNA unter selbstspleißenden Bedingungen

Spur b: in vitro transkribierte RNA

Marker M1: pBR322, geschnitten mit RsaI (Bandengrößen: 2117, 1556 und 680 bp)

Marker M2: M13, geschnitten mit DdeI (Bandengrößen: 998, 866, 672, 652, 600, 554, 399, 381, 367, 303, 294, 272, 160, 152 bp; außerdem 12 kleinere Banden die auf dem Gel nicht mehr sichtbar sind)

3. 3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung zur Natur der Introntranskripte

- Die beiden Introntranskripte zeigen im Harnstoff-Agarose-Gel ebenso wie nach Glyoxylierung und Auftrennung im Agarosegel ein Laufverhalten, das auf eine Länge von 2500b und 2300b schließen läßt.
- Beide Introntranskripte haben Lariatstruktur. Dies zeigen elektronenmikroskopische Untersuchungen, Primer-Extension-Versuche und die Hybridisierung mit Oligonukleotid 3.
- Die Größenunterschiede der beiden Introntranskripte sind nicht auf eine Exzision einer Sequenz innerhalb oder an den Flanken der Moleküle zurückzuführen.
- Verschiedene Sekundärstrukturen der Moleküle sind nicht der Grund für ihr verschiedenes Laufverhalten im Gel.
- Es besteht die Möglichkeit, daß die Verschiedenheit der beiden Introntranskripte auf verschiedene Lariatverknüpfungspunkte zurückzuführen ist.
- Das Gruppe II-Intron aus dem cob-Gen von *S. pombe* kann unter selbst-spleißenden Bedingungen nicht aus dem Vorläufertranskript exzisiert werden.
- Es gibt ein Transkript, das 100b des Introns und vermutlich die gesamten Sequenzen des 2. Exons enthält und 600-700b lang ist.

C. Mutanten

1. Phänotyp und Deletionsorte der Mutanten

Die Untersuchung einer Palette von Mutanten mit gleichem Phänotyp, aber unterschiedlichen Deletionsorten und -größen soll eine allgemeine Aussage über die Auswirkung der Deletionen auf die Transkriptreifung oder eine Identifizierung bestimmter Funktionsdomänen ermöglichen.

Für die Transkriptuntersuchungen wurden zehn mit Mutanten verwendet, deren Deletionen im cob-Genbereich liegen und deren Deletionsgrößen sich von 40-800 bp erstrecken. Diese Mutanten sind zum großen Teil sequenziert und ihre Deletionen basengenau bestimmt (Ahne et al., 1984; Ahne, 1985). Die Lokalisation der Deletionen und ihre genaue Länge sind aus Figur 3 und Tabelle 3 zu ersehen. Die Mutanten sind aufgrund ihrer Deletionsorte in vier Gruppen einzuteilen: 1. Mutanten mit Deletion in den Exonbereichen; 2. Mutanten mit Deletion an den Intronflanken, in der Nähe der Introngrenzen; 3. Mutanten mit Deletion innerhalb des Introns; 4. Eine Mutante, deren Deletion den 5'-Spleißpunkt des Introns überstreicht.

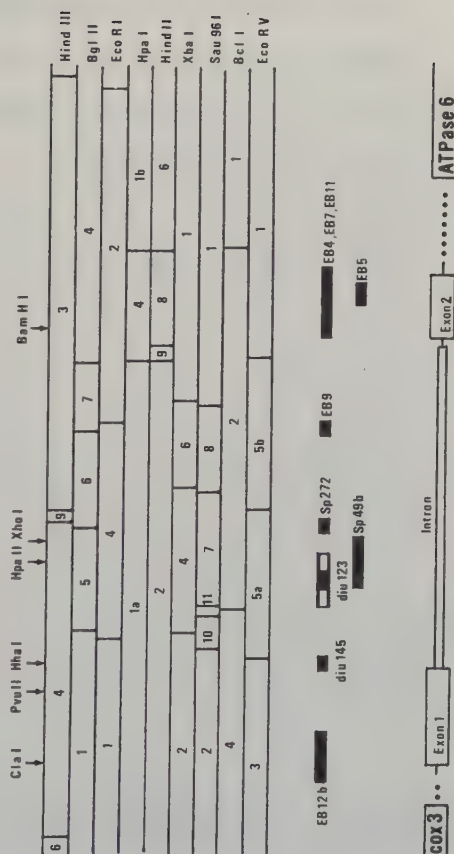
Alle Mutanten zeigen cob⁻-Phänotyp, d.h. ein funktionierendes Cytochrom b-Apoprotein wird nicht hergestellt. Dies wurde durch Tieftemperaturspektroskopie und Enzymtest nachgewiesen (Ahne et al., 1984).

2. Transkriptcharakterisierung

Für die Charakterisierung der Transkripte, welche die verschiedenen Mutanten für das Cytochrom b herstellen, wurde mit RNA dieser Mutanten auf denaturierenden Gelen (Harnstoff-Agarose- oder Quecksilber-Agarose-Gele) aufgetrennt, an ein Trägermaterial (ABM- oder APT-Papier) gebunden und durch Hybridisierung mit geeigneten DNA

Figur 3: Lokalisation der Deletionen der untersuchten Cytochrom b-defekten Mutanten

Bei Mutante diu123 ist die genaue Lage der Deletion nicht bekannt. Der ausgefüllte Balken gibt den sicheren Umkreis der Deletion an, der nicht ausgefüllte gibt die Position an, in der sich die Deletion befinden kann (Ahne et al., 1984).



cob

Mutante	Ausdehnung der Deletion	Länge der Deletion (bp)	betroffenes Genstück
EB 12b	nicht sequenziert; ClaI-Stelle deletiert; tRNA intakt	etwa 300	Leader, E1
diu 123	nicht sequenziert; Deletion im Intron	etwa 50	I
diu 145	10835/6-10881/2	46	E1/I
Sp 49b	11473-11892	419	I
Sp 272	11966-12000	34	I
EB 9	12730-12769	39	I
EB 4	13382-13922	540	E2
EB 7			
EB 11			
EB 5	13634-13852	218	E2

Tabelle 3: Länge, Anfangs- und Endpunkte der Deletionen der untersuchten Mutanten (nach Ahne et al., 1984; Ahne, 1985)

E1 (2) = 1. (2.) Exon

I = Intron

Proben (Northern-Hybridisierung) die Herkunft der Transkripte identifiziert.

2. 1. Auftrennung der mt RNA auf Harnstoff-Agarosegelen (bzw. Quecksilber-Agarosegelen) und Anfärbung mit Ethidiumbromid

Die mt RNA der zehn Mutanten wurde zunächst wie beschrieben präpariert und auf einem Harnstoff-Agarose-Senkrechtgel aufgetragen. Im Vergleich zum Wildtyp treten bei allen Mutanten mehrere verschieden lange Präkursortranskripte auf. Bei vielen Mutanten ist das größere der beiden Introntranskripte bereits im EB-gefärbten Gel sichtbar. Diese 2500 b-RNA ist als dünne Bande zwischen der LrRNA und der cytoplasmatischen RNA zu erkennen. Eine An- oder Abwesenheit der kleinen Intron-RNA-Bande läßt sich im angefärbten Gel nicht feststellen, da sie gleiche Laufgeschwindigkeit hat wie die cytoplasmatische RNA, die als Verunreinigung mit aufgetrennt wird und immer in gleicher Konzentration vorliegt (Abb. 25). Bei Introns anderer Organismen (z.B. Intron 1 aus cob von S. cer.) liegt deren RNA in weitaus geringerer Konzentration vor oder ist instabil, so daß sie im EB-gefärbten Gel nicht sichtbar ist.

Das Vorliegen der Intron-RNA in sichtbaren Konzentrationen bietet den Vorteil, daß diese speziellen RNA-Banden aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert werden können, um sie für weitere Versuche zu verwenden.

2. 2. Northern-Analysen

Zur Hybridisierung auf Filter gebundener mt RNA wurden die gleichen DNA-Proben wie für die Wildtypuntersuchungen verwendet.

Allen Mutanten ist gemeinsam, daß sie in Northern-Analysen mit DNA-Proben aus dem Exonbereich kein reifes oder verkürztes cob-Transkript zeigen. Alle bilden ein Präkursortranskript aus, das je nach Deletionslänge in seinen Ausmaßen variiert.

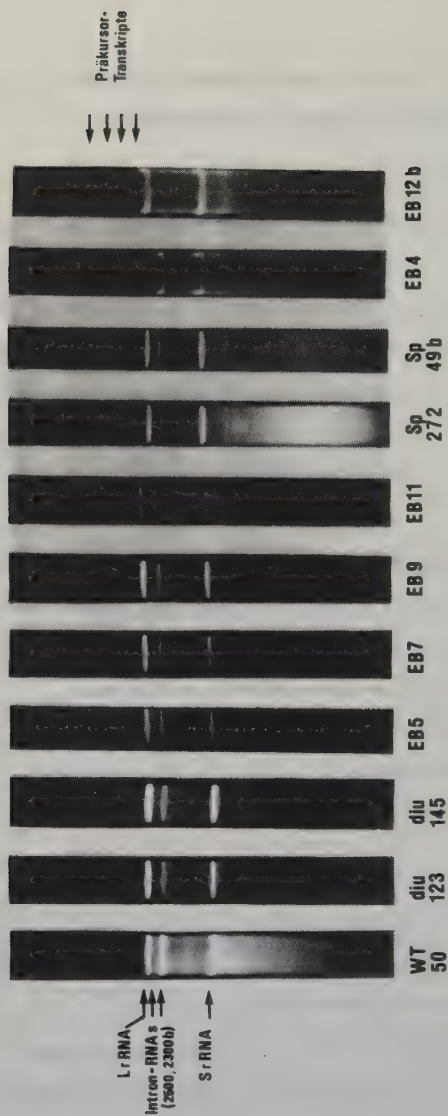


Abb. 25

Abb. 25: mtRNA der untersuchten Mutanten

Gesamte mtRNA der Mutanten wurde auf Harnstoff-Agarose-Gelen (bzw. Quecksilber-Agarose-Gelen: EB4, EB12b) aufgetrennt und mit EB angefärbt.

Hinsichtlich des Verhaltens der Mutanten bei Hybridisierung der RNA mit Intron-DNA-Proben und der Lokalisation ihrer Deletionen lassen sich die Mutanten in vier Gruppen einteilen.

Gruppe 1: Exonmutanten (EB12b, EB5, EB4, EB7, EB11)

Sie zeigen bei Hybridisierung der mt RNA mit Intron-DNA-Proben beide Introntranskripte, die auch im Wildtyp ausgebildet werden. Sie sind längenmäßig identisch mit den Wildtyp-RNA-Banden. Während Mutanten EB12b und EB5 diese beiden Transkripte verglichen zum Wildtyp in etwa gleicher Konzentration herstellen, findet man bei Mutanten EB4, 7, und 11 diese Transkripte in einer stark verminderten Konzentration. Gemeinsam ist diesen Exonmutanten das Auftreten einer Präkursor-RNA-Bande bei Hybridisierung mit Intron-DNA-Proben; diese ist identisch mit der mit Exon-DNA-Proben erhaltenen RNA-Bande. Durch Hybridisierung mit mehreren Intron- und Exon-DNA-Proben stellte sich heraus, daß das Präkursor-RNA-Molekül Leader-, Exon 1-, Exon 2-, Intron- und Trailerbereich umfaßt und nur mit DNA-Proben aus dem jeweiligen Deletionsbereich nicht hybridisiert. Je größer die Deletion der Mutante ist, desto kürzer ist das Präkursortranskript (Abb. 26).

Mutanten EB4, 7 und 11 besitzen identische Deletionen und verhalten sich bezüglich der Ausbildung von Introntranskripten identisch. Jedoch unterscheidet sich Mutante EB4 insofern von EB7 und EB11, als sie wesentlich weniger RNA produziert. Auch dauert die Anzucht wesentlich länger, was darauf hindeutet, daß diese Mutante eine Sekundärmutation trägt.

Gruppe 2: Mutanten mit Deletionen an den Intronflanken (diu123, EB9)

Sie zeigen bei Hybridisierung mit Intron-DNA-Proben nur das größere der beiden beim Wildtyp auftretenden Introntranskripte. Dieses Transkript besitzt gleiches Laufverhalten wie das des Wildtyps.

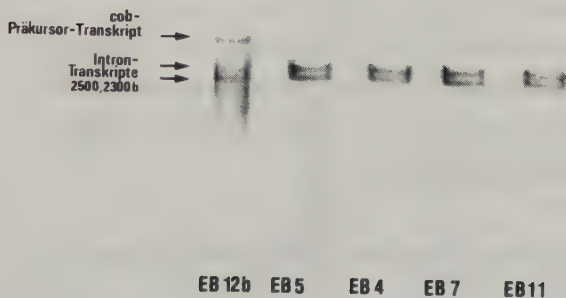


Abb. 26: Hybridisierung der mtRNA der Mutanten der Gruppe 1 mit Intron-DNA

Gesamte mtRNA wurde auf Harnstoff-Agarose-Gelen aufgetrennt und auf APT-Papier transferiert. Das Autoradiogramm zeigt zwei Introntranskripte und ein Präkursortranskript.

Beide Mutanten stellen dieses Introntranskript in ungefähr gleicher Konzentration her, jedoch ist die Transkriptkonzentration der Mutante verglichen mit dem Wildtyp verringert. Auch zeigen sie ein in seiner Länge variables Präkursor-Transkript, das Leader-, Exon 1-, Intron-, Exon 2- und Trailerbereich umfaßt (Abb. 27).

Gruppe 3: Mutanten mit Deletion im Intronbereich (Sp49b, Sp272)

Sie zeigen bei Hybridisierung mit Intron-DNA-Proben keines der beiden Intron-Transkripte, die man beim Wildtyp findet. Da mit Northern-Analysen geringe RNA-Mengen nicht mehr sichtbar gemacht werden können, kann nicht selbstverständlich davon ausgegangen werden, daß kein Intron-Transkript prozessiert wird.

In der Northern-Analyse sind die Präkursormoleküle sichtbar, die wie im Falle der Mutanten der Gruppen 1 und 2 Leader-, Exon 1-, Exon 2-, Intron- und Trailerbereich umfassen und je nach Größe ihrer Deletion unterschiedliche Länge aufweisen (Abb. 28).

Gruppe 4: Mutante diu145 mit Deletion des 5'-Spleißpunktes des Introns

Mutante diu145 zeigt gleiches Hybridisierungsverhalten wie die Mutanten diu123 und EB9 der Gruppe 2 (Abb. 29). Da es sich jedoch um eine Deletion der 5'-Spleißstelle des Introns handelt, soll diese Mutante in einer gesonderten Gruppe behandelt werden. Sie stellt das größere der beiden Introntranskripte sowie eine Präkursor-RNA her. Sie ist die einzige Mutante, deren Deletion im konservierten gepaarten Bereich des Sekundärstrukturmodells liegt (Abb. 33). Da sie offensichtlich in der Lage ist, doch noch eines der Introntranskripte herzustellen, wurde diese Mutante hinsichtlich neuer Spleißstellen genauer untersucht (siehe Punkt 4.).

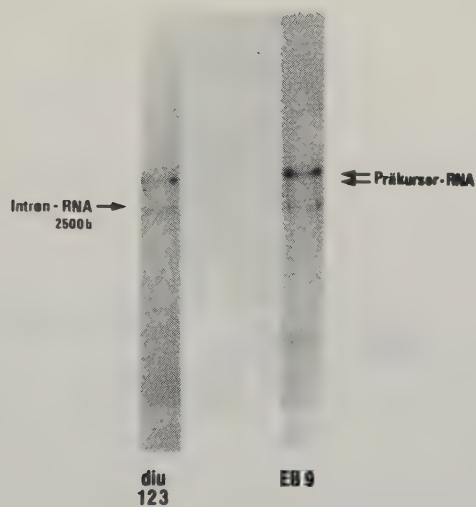


Abb. 27: Hybridisierung der mRNA der Mutanten der Gruppe 2 mit Intron-DNA

Die mRNA wurde behandelt wie in Abb. 26 beschrieben.

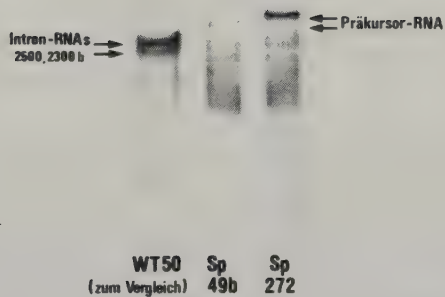


Abb. 28: Hybridisierung der mtRNA der Mutanten der Gruppe 3 mit Intron-DNA

Die mtRNA wurde behandelt wie in Abb. 26 beschrieben.



diu 145

Abb. 29: Hybridisierung der mRNA von Mutante diu145 mit Intron-DNA

Die mRNA wurde behandelt wie in Abb. 26 beschrieben.

Da keine der Mutanten mit Deletion im Intron (Gruppe 2, 3 und 4) mehr in der Lage ist, das 2300 b-Transkript herzustellen, liegt die Vermutung nahe, daß eine Deletion im Intronbereich zu einer Verhinderung der Synthese oder Stabilität des 2300 b-Introntranskriptes führt. Auch wenn bisher nicht geklärt werden konnte, was die unterschiedliche Natur der beiden Intronmoleküle bewirkt, so erscheint es jedoch durch die Untersuchungen an den Mutanten als naheliegend, daß das 2300 b-Transkript durch irgendeine Veränderung des 2500 b-Transkriptes entstanden ist.

3. Transkriptkartierung

3.1. S1-Analysen

Eine Methode, die auch geringe Konzentrationen von RNA entdeckt und eine Kartierung wenigstens meist auf 2-10 b genau erlaubt, ist die Kartierung mit S1-Nuklease. Diese wurde mit allen Mutanten durchgeführt; bei jedem Experiment wurden parallel dazu S1-Experimente am Wildtyp durchgeführt. Wenn auch eine basengenaue Festlegung von Anfangs- und Endpunkten der Transkripte nicht immer möglich war, so erlaubte doch der Vergleich zum Wildtyp wertvolle Aussagen.

Die wichtigsten für S1-Analysen verwendeten DNA-Proben sind in Figur 2 (Punkt 2.1.2.) ersichtlich. Die meisten S1-Experimente wurden mit Wildtyp-DNA ausgeführt; in Bereichen der Deletionen wurde Mutanten-DNA verwendet.

Parallel zu den S1-Analysen wurde die verwendete DNA nach Maxam und Gilbert (1980) sequenziert und neben den S1-Versuchen auf dem Acrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. So war eine Zuordnung der S1-Signale zu den Basen der Sequenz direkt möglich.

Tabelle 4 zeigt die S1-Signale der Mutanten im Exonbereich des cob-Gens.

3.1.1. Leader

Beim Wildtyp beginnt der Leader 179-181 b upstream vom AUG-Startcodon des Cytochrom b-Gens. S1-Analysen für die Mutanten mit Wildtyp-RNA als Vergleich ergaben in jedem Fall (außer Mutante EB12b) mit dem Wildtyp identische Signale. Daraus kann gefolgert werden, daß die Mutanten (außer EB12b, die im Leader deletiert ist) in ihrer Präkursor-RNA unverkürzten Leaderanteil enthalten.

3.1.2. Trailer

Mit dem Wildtyp identische S1-Signale zeigen im Trailerbereich die Mutanten EB12b, Sp49b, diu123, diu145, Sp272 und EB9. Die Mutanten EB4 und 7, deren Deletionen Exon 2 und einen Teil des Trailers umfassen, zeigen in der S1-Analyse Signale, die, verglichen mit dem Wildtypsignal, ungefähr 15-20 b weiter in 3'-Richtung liegen; d. h. diese Mutanten besitzen in ihrer Präkursor-RNA einen verlängerten Traileranteil. Diese Signale befinden sich ungefähr am 5'-Beginn der tRNA^{Met}.

Mutante EB11, von der ein ähnliches Signal zu erwarten wäre, wurde hinsichtlich des Auftretens einer Trailersequenz nicht untersucht.

Für Mutante EB5 kann mit der verwendeten DNA-Probe kein S1-Signal gefunden werden. Dies deutet darauf hin, daß das Präkursormolekül der Mutante EB5 wahrscheinlich nur Sequenzen bis zum Beginn ihres Deletionsanfanges enthält. Falls dies richtig ist, so war es mit dem verwendeten Versuchsansatz nicht möglich, dieses 3'-Ende zu erfassen. Das 3'-Ende dieses Transkriptes würde sich nämlich ungefähr 270 bp nach dem Beginn des 2. Exons befinden. Es würde zwar mit der zur Bestimmung der Trailer-Sequenzen verwendeten DNA-Probe hybridisieren, jedoch war die Bereitung der Gele und ihre Laufzeit nur geeignet, S1-Signale zu entdecken, die ungefähr 150-250 bp von der Markierungsstelle entfernt waren. Das mögliche S1-Signal für EB5 würde jedoch ungefähr 600 bp von

der Markierungsstelle entfernt liegen und durch die Versuchsanordnung nicht mehr erfaßt werden.

3.1.3. Anfangs- und Endpunkte der Exons

Zur genauen Kartierung von 5'- und 3'- Ende von Exon 1 und 5'- und 3'- Ende von Exon 2 wurden S1-Versuche durchgeführt. Tabelle 4 soll die erhaltenen Ergebnisse veranschaulichen.

Ein Signal für das 3'- Ende des 1. Exons findet sich bei allen Mutanten (außer den Mutanten diu145 und diu123, die in diesem Bereich deletiert sind). Dieses Signal deutet darauf hin, daß die Mutanten noch fähig sind, die Präkursor-RNA zu schneiden; dies trifft auch auf die Mutanten Sp49b und Sp272 zu, die in Northern-Analysen nur Präkursor-RNA zeigten. Northern-Analysen waren offensichtlich zu wenig empfindlich, die geschnittenen RNA Moleküle (besonders die oder das Introntranskript(e)) zu entdecken. Es ist anzunehmen, daß ein solches Introntranskript in sehr geringer Konzentration vorliegt, da sich entweder ein Schneiden des Präkursormoleküles selten ereignet oder das erhaltene Introntranskript sehr instabil ist.

Außer den Mutanten 8B4, 7, und 11, deren Deletionen das 2. Exons betreffen, zeigen alle Mutanten ein S1-Signal am 5'-Ende des 2. Exons, was die Vermutung verstärkt, daß ein Herausschneiden der Intronsequenz erfolgt, jedoch ein Zusammenfügen der Exonanteile nicht mehr möglich ist.

3.1.4. Anfangs- und Endpunkte des Introns

Für das 5'- Ende des Introns zeigen alle Mutanten (außer diu145 und diu123) das gleiche Signal wie der Wildtyp. Für Mutante diu145 wurde S1-Analyse mit Mutanten-DNA durchgeführt, da sie in diesem Bereich deletiert ist. Hier zeigten sich viele Signale, was die Vermutung nahelegte,

daß diese Mutante einen oder mehrere neue(n) Spleißpunkt(e) für das Schneiden des Introns geschaffen hat.

S1-Signale am 3'-Ende des Introns sind sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutanten schwer zu interpretieren, da eine Anhäufung von Signalen auftritt.

Aus den Ergebnissen der Punkte 3. 1. 3. und 3. 1. 4. und der Northern-Hybridisierungen geht hervor, daß wohl alle Mutanten in der Lage sind, ein (oder mehrere) Introntranskript(e) aus dem Präkursor-RNA-Molekül herauszuschneiden. Im Falle der Mutanten Sp49b und Sp272 liegt (liegen) dies(e) wohl in so geringer Konzentration vor, daß es (sie) durch Northern-Analysen nicht entdeckt werden kann (können). Ein reifes cob-Transkript kann in keiner Mutante hergestellt werden; eine Bande, die nur aus Exon 1 oder Exon 2 besteht, tritt in Northern-Analysen ebenfalls nicht auf. So sind diese Mutanten zwar spleißdefekt (als "Spleißen" wurden zwei Funktionen definiert: a) Schneiden an den Spleißstellen und b) Ligation der Exonanteile), jedoch können sie den ersten Schritt, nämlich das Schneiden des Präkursormoleküls durchführen. Die Fähigkeit zur Ligation der Exonprodukte ist durch die Deletionen gestört.

3. 2. Transkript mit 5'-Ende im Intron und Exon 2-Anteilen

Parallel zur Situation im Wildtyp wurde in allen Mutanten (die Mutante EB11 wurde nicht untersucht) ein Transkript gefunden, dessen 5'-Ende am Beginn des geschlossenen Leserahmens des Introns liegt. Im Vergleich zum Wildtyp beginnt dieses Transkript bei den Mutanten basengenau an der gleichen Stelle. Abb. 10 zeigt die Situation im Wildtyp, die bei den Mutanten identisch ist.

Auch bei den Mutanten kann keine Aussage über die Herkunft oder Funktion dieser RNA-Spezies getroffen werden. Da aber Mutanten diu145, diu123

Untersuchter Genort	S1-Signal in der Sequenz	WT 50	EB 12b	EB 5	EB 4	EB 7	EB 11	diu 123	diu 145	EB 9	Sp 49b	Sp 272
Leader	TAATTAGCAAT	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3'-E1	CTGATAAAATTG	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
5'-E2	GTTCAATGATT	+	+	+	-	-	*	+	+	+	+	+
3'-E2	AAACGATAAA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trailer	viele Signale	+	+	-	#	#	#	+	+	+	+	+

Tabelle 4: S1-Signale im Exonbereich des Cytochrom b-Gens für die untersuchten Mutanten

Zeichenerklärung:
 # = Signale unterscheiden sich in ihrer Lokalisation von denen im Wildtyp
 * = es liegen keine Daten vor

und EB9 dieses Transkript, nicht aber das 2300 b-Transkript herstellen, läßt sich daraus folgern, daß das unidentifizierte Transkript entweder nicht durch Prozessieren aus dem 2300 b-Transkript entsteht oder daß es weit stabiler ist als das 2300b-Transkript, aus dem es hervorgegangen ist. Da darüber hinaus auch Mutanten Sp49b und Sp272, die weder das 2500 b- noch das 2300 b-Transkript herstellen (oder höchstens in sehr geringer Menge), dieses neue Transkript aufweisen, bedeutet dies, daß die bisher unbekannte RNA entweder durch einen anderen Prozessierungsmechanismus entstehen muß als die beiden Introntranskripte oder bei diesen Mutanten die 2500 b- und 2300 b-Introntranskripte durch die Deletionen in ihrer Stabilität empfindlich gestört sind, was bei der "neuen" RNA-Spezies nicht der Fall ist. Man kann also für die Reifung der Präkursor-RNA des cob-Genes zwei verschiedene Prozessierungswege fordern.

4. Die Deletion der Mutante diu145 umfaßt den 5'-Intronspleißpunkt

Mutante diu145 weist eine Deletion von 46 bp auf, die den 5'-Spleißpunkt des Introns (beim Wildtyp) einschließt. Diese Mutante stellt ein besonders interessantes Untersuchungsobjekt dar, da sie offensichtlich trotz Fehlens des 5'-Spleißpunktes in der Lage ist, das größere der beiden Introntranskripte herzustellen. Das bedeutet, daß die Mutante einen oder mehrere andere Spleißpunkte besitzt und benützt. Darauf deuten bereits S1-Experimente hin. Im Autoradiogramm findet sich eine Vielzahl von Signalen, die von der PvuII-Stelle im 1. Exon (Ende der DNA-Probe) bis 100 b nach dem 5'-Ende des Introns (im Wildtyp) auftreten. Dieses Ergebnis weist auf die Benützung mehrerer Spleißpunkte hin.

Mit Hilfe von Primer-Extension wurde versucht, die RNA-Situation zu klären und den (die) alternativen Spleißpunkt(e) zu erfassen.

4. 1. Untersuchung des Präkursor-Transkriptes aus Mutante diu145 durch Primer-Extension

Die Präkursor-RNA aus diu145 wurde mit dem Exon-Primer (Primer E, siehe Abb. 18) hybridisiert, der bereits für die Wildtypuntersuchungen verwendet wurde. Primer-Extension mit reverser Transkriptase zeigen den Exon 2-übergang der Präkursor-RNA der Mutante. Die Sequenz des RNA-Präkursormoleküls in diesem Bereich stimmt basengenau mit den Sequenzen für Exon 2 und Intron überein. Im Intron können noch 45 bp gelesen werden, die mit der DNA Sequenz identisch sind (Abb. 30).

4. 2. Primer-Extension mit Intron-Primer und isolierter Intron-RNA aus Mutante diu145 zur Identifizierung des neuen Spleißpunktes

Um den 5'-Spleißpunkt der Mutante diu145 näher zu charakterisieren, wurde Primer-Extension des Intron-Primers (Primer I, siehe Abb. 18) mit isolierter Mutanten-Intron-RNA als Vorlage durchgeführt. Man würde bei einer Verlegung des Spleißpunktes entweder wie bei Primer-Extension-Versuchen im Wildtyp ein starkes Stoppsignal erwarten, jedoch an veränderter Position, oder im Falle einer echten Zirkularisierung des Transkriptes nach Erreichen des Deletionspunktes eine Sequenzfolge, die im 3'- Bereich des Introns weiterliest.

Das Ergebnis dieser Primer-Extension erfüllte keine der getroffenen Voraussagen (Abb. 31). Die Sequenz nach Primer-Extension zeigt kein starkes Stoppsignal, ebensowenig Sequenzen des 3'- Endes des Introns. Im Autoradiogramm sind nach Primer-Extension (mit Didesoxynukleotiden zur Sequenzbestimmung) zunächst die Sequenzen des Introns bis zur Deletion lesbar. An diese Intronsequenzen schließen sich direkt die Sequenzen des ersten Exons an, beginnend mit dem 5'-ständigen Nukleotid vor der Deletion. Die Sequenz der erhaltenen cDNA (=Intron-RNA der Mutante) läßt sich im Autoradiogramm sehr gut bis 45 Nukleotide 5'-seitig von der

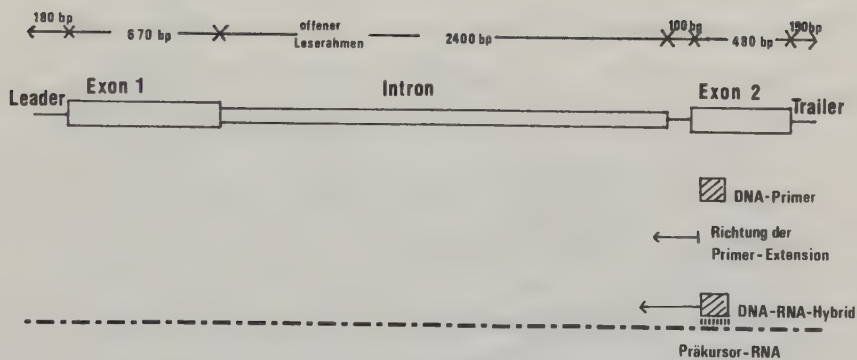


Abb. 30: Versuchsanordnung zur Primer-Extension mit Exon-Primer und Präkursor-RNA aus diu145

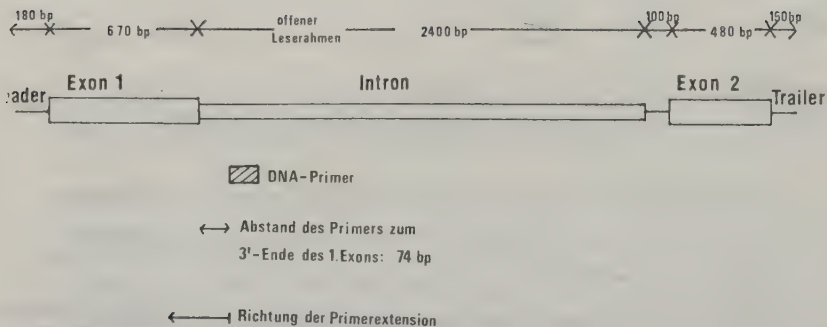


Abb. 31: Versuchsanordnung zur Primer-Extension mit Intron-Primer und Intron-RNA aus diu145

Deletionsstelle entfernt lesen. Hier scheint einer von mehreren neuen Spleißpunkten lokalisiert zu sein, da ab hier die Sequenz relativ schwach wird und nur noch aufgrund verschiedener geclusterter Nukleotide (hauptsächlich Thymidin, d.h. in der cDNA Adenosin) verfolgt werden kann. Diese schwache Sequenz besitzt ungefähr 100 Nukleotide, gerechnet von der 5'-Deletionsstelle der Mutante. Nach etwa 50 weiteren Nukleotiden erscheint noch einmal ein sehr schwaches Signal in der Sequenz. Ausgehend vom Original-Spleißpunkt des Wildtyps *S. pombe* 50 liegen die drei "Hauptspleißpunkte" der Mutante 66, 123 und etwa 170 Nukleotide 5'-seitig vom Originalspleißpunkt. Der 170b entfernt liegende Spleißpunkt wird wohl mit der geringsten Effizienz verwendet, da das dazugehörige Signal nur noch sehr schwach erkennbar ist (Abb. 32).

Primer-Extension-Versuche ohne Didesoxynukleotide (parallel gelaufen zu Primer-Extensionen mit Didesoxynukleotiden) deuten darauf hin, daß auch andere neue Spleißpunkte verwendet werden, die näher als 66 Nukleotide vom Originalspleißpunkt entfernt gelegen sind. (Durch die Primer-Extension-Versuche ohne Didesoxynukleotide werden nur Abbrüche der neu synthetisierten cDNA erfaßt, d.h. Signale treten nur dann auf, wenn die cDNA nicht mehr weiter synthetisiert wird. Durch die parallellaufende Sequenz, die man durch Zugabe der Didesoxynukleotide erhält, kann man die "Abbruchsignale" relativ genau den Sequenzen der DNA zuordnen.)

Dieses Ergebnis bietet eine mögliche Erklärung, warum diese Mutante nicht in der Lage ist, ein reifes cob-Transkript herzustellen. Wegen der Lage des Deletionsortes und durch Schneiden des Primärtranskriptes an einem neuen Spleißpunkt im 1. Exon fehlen diesem entstandenen Exon wesentliche 3'-Sequenzen, die für eine Ligation von Exon 1 und Exon 2 nötig wären. Weiterhin hat die Deletion am 5'-Spleißpunkt Auswirkung auf die Herstellung des 2300 b-Transkriptes.

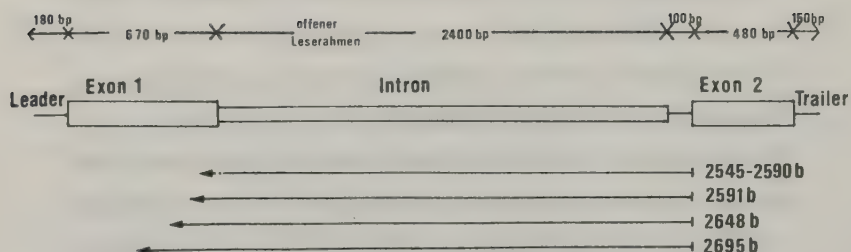


Abb. 32: Schematische Darstellung der neuen Spleißpunkte für Mutante diu145

Die Pfeilspitzen markieren die neuen Spleißpunkte.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse der Transkriptuntersuchungen für Cytochrom b-defekte Deletionsmutanten

- Die Mutanten können kein reifes (auch kein verkürztes) Cytochrom b-Transkript herstellen.
- Sie bilden ein Präkursortranskript aus, das neben den Sequenzen für Exon 1, Intron und Exon 2 auch Leader- (außer EB12b) und Trailersequenzen (außer EB5) enthält.
- Das Transkript, das bereits beim Wildtyp in der S1-Analyse auftrat und das Intron- und Exon 2-Sequenzen enthält, wird von allen Mutanten hergestellt (Mutante EB11 wurde nicht untersucht).
- Die Lokalisation der Deletionen steht im Zusammenhang mit der Fähigkeit, Introntranskripte zu synthetisieren:
Mutanten mit Deletion im Exon können wie der Wildtyp zwei Introntranskripte herstellen.
Mutanten mit Deletionen an den Intronflanken, sowie die Mutante mit Deletion am 5'-Spleißpunkt des Introns synthetisieren nur noch das größere Introntranskript.
Mutanten mit Deletion innerhalb des Introns können kein in Northern-Analysen sichtbares Introntranskript mehr herstellen.
- Das Introntranskript der Mutante diu145 beinhaltet Exon 1- Anteile. Es gibt mehrere Spleißpunkte, die von dieser Mutante aktiviert werden.

IV. DISKUSSION

überblick über die Reifung von Mosaikgenen im Kern

Die Reifung der Prä-mRNA bei Mosaikgenen zum reifen Transkript erfolgt über mehrere Schritte, an denen verschiedene Funktionen beteiligt sind. Das Präkursortranskript wird prozessiert, d.h. die Intronsequenzen werden herausgeschnitten und die Exonanteile aneinandergefügt. Der Mechanismus, der diesem Ablauf zugrunde liegt, war lange Zeit im unklaren. In letzter Zeit konnten zumindest für proteinkodierende Mosaikgene im Kern einige wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden, da es möglich wurde, Mosaikgene unter in vitro-Bedingungen zu transkribieren und die Reifung der hergestellten Prä-RNA zu studieren. In vitro transkribiert und untersucht wurden Prä-RNA-Moleküle eines Adenovirus 2-Genes (AdML=major late Adenovirus gene, ein Gen des Adenovirus, das in der späten Phase transkribiert wird; Hernandez und Keller, 1983; Hardy et al., 1984; Padgett et al., 1984), das Beta-Globin-Gen des Menschen mit einem bzw. zwei Introns (Krainer et al., 1984; Ruskin et al., 1984) und ein Gen aus Drosophila (fushi tarazu-Gen=ftz-Gen; Reed und Maniatis, 1985). In vivo wurden folgende Prä-RNAs und ihre Produkte untersucht: hn-RNA aus HeLa (Wallace und Edmonds, 1983), beta-Globin-RNA aus fetaler Kaninchenleber (Zeitlin und Efstatidis, 1984), RNA aus dem nuklearen ribosomalen Protein 51A aus Hefe (Rodriguez et al., 1984) und die RNA für das ADC1-Actingen aus Hefe (Domdey et al., 1984).

Diese Untersuchungen ergaben übereinstimmend, daß für die Reifung der Präkursor-mRNA zwei Enzymfunktionen verantwortlich sind, eine Endonuklease- und eine RNA-Ligaseaktivität. Diese beiden Funktionen übernimmt möglicherweise in Mitochondriengenomen die sogenannte "Maturase", ein Protein, auf dessen Existenz zumindest für Intron 2, 3 und 4 des Cytochrom b-Genes und Intron 1 des cox1-Genes aus S. cer. einige

Versuche deuten (z.B. Lazowska et al., 1980; Review: Grivell und Borst, 1982).

Bei anderen mitochondrialen Introns mit offenem Leserahmen, der in Phase zum vorangegangenen Exon verläuft, liegt die Vermutung nahe, daß auch in diesen Fällen eine solche Maturase hergestellt wird, z.B. im untersuchten *cob*-Gen aus *S. pombe* 50 (Details werden später genauer beschrieben) oder im *cox1*-Gen von *P. anserina*.

Bei der Reifung der prä-RNA der Kernmosaikgene wird zunächst das 5'-Ende des Introns in der Präkursor-RNA erkannt (die Sequenz "GU" am 5'-Ende des Introns ist für diese Gene konserviert und trägt zur Erkennung dieser Schnittstelle bei) und endonukleolytisch geschnitten. Es entstehen zwei RNA-Spezies, die Intermediate in der Reifung darstellen. Es sind dies die RNA des 1. Exons und eine RNA, bei der die Intronsequenz mit der des 2. Exons verbunden ist. Diese 2. RNA-Spezies kommt in einer besonderen Konformation vor. Der 5'-seitige Guanosinrest des Introns bildet mit einem Adenosinrest, der in der sogenannten "PyXPuTPuAPy"-Box relativ nahe am 3'-Ende des Introns liegt, eine 2'-5'-Phosphoesterbindung, so daß ein Molekül in Lassoform entsteht. Da dieser Adenosinrest außerdem durch die normale 3'-5'-Phosphoesterbindung mit dem benachbarten Nukleotid der Sequenz verknüpft ist, trägt dieses Adenosin zwei Phosphoesterbindungen und bildet einen Verzweigungspunkt im Molekül. Die "PyXPuTPuAPy"-Box wurde durch Vergleich verschiedener Verzweigungspunkte und ihrer Umgebung bei verschiedenen Säuger-beta-Globin-Genen entdeckt. Keller und Noon (1985) formulierten diese Box als CTGAC-Box, indem sie die Umgebung von 3'-Spleißsites bei Säugergenen untersuchten. Für Hefe läßt sich auch eine Konsensussequenz formulieren, jedoch sind hier die Sequenzanforderungen offensichtlich stringenter; sie wurde als TACTAAC-Box bezeichnet (Langford und Gallwitz, 1983; Pikielny et al., 1983). Diese TACTAAC-Box, wie auch die CTGAC-Box, sind wohl spezielle Sequenzen der allgemein formulierten "PyXPuTPuAPy"-Box.

Die Reifung der mRNA erfolgt durch Schneiden am 3'-Ende des Introns (hier spielen zwei konservierte Nukleotide "AG" am 3'-Ende des Introns eine Rolle bei der Erkennung), so daß Exon1 und Exon2 ligiert werden können, die dann das reife Transkriptionsprodukt darstellen. Das Intron bleibt in Lariatform erhalten, was durch Primer-Extension-Versuche und Behandlung mit spezifischen RNasen nachgewiesen werden konnte (Review: Keller, 1984).

Das cob-Intron aus *S. pombe* liegt als Lariat vor

Untersuchungen des Introntranskriptes des cob-Genes bei *S. pombe* haben gezeigt, daß hier die reife Intron-RNA als Lariat vorliegt. Als Gruppe II-Intron fehlen ihm die bei den Gruppe I-Introns konservierten Sequenzen am 5'- und 3'-Ende. Die Sequenzen "GU" am Beginn und "AG" am Ende des Introns liegen hier nicht vor. Das Ungewöhnliche bei den Gruppe II-Introns ist, daß sie als exsisierte Transkripte in stabilem Zustand auftreten und im Elektronenmikroskop als Zirkel erscheinen (Arnberg et al., 1980; Halbreich et al., 1980; Hensgens et al., 1983). Bereits 1983 haben Grivell et al. (1983) die Annahme geäußert, daß der Ringschluß dieser Moleküle nicht durch eine normale 3'-5'-Phosphodiesterbindung zustandekommt.

Bisher sind unter den Gruppe II-Introns drei Spezies bekannt, die in Lariatform vorliegen. Es sind dies das in dieser Arbeit untersuchte Intron des cob-Gens aus *S. pombe*, das Intron 1 aus cob von *S. cer.* (Schmelzer und Schweyen, Manuskript eingereicht) und das Intron 5 gamma aus dem *cox1*-Gen aus *S. cer.* (Van der Veen et al., 1986, Peebles et al., 1986).

Van der Veen et al. (1986) haben in ihrer Arbeit Hinweise gefunden, daß sich der Verzweigungspunkt des Lariats für Intron 5 gamma acht Nukleotide vom 3'-Ende des Introns entfernt befindet. Dies erklärt auch, warum dieses Intron im Elektronenmikroskop als zirkuläres Molekül erscheint. Sie haben festgestellt, daß sich dieser vermutliche Verzweigungspunkt in

einer konservierten Palindromsequenz befindet, die für alle Gruppe II-Introns ähnlich ist.

Van der Veen et al. (1986) machten eine Auflistung dieser konservierten Palindromsequenzen für verschiedene Gruppe II-Introns (Intron 1, 2 und 5 gamma aus *cox1* von *S. cer.*, Intron 1 aus *cob* von *S. cer.*, *cox2*-Intron aus *Zea mays*, Intron aus *cox1* aus *Podospora*, *cob*-Intron aus *S. pombe*, sowie zwei tRNA-Gene aus Chloroplasten wurden hier verglichen.). Der Vergleich ergab, daß diese Sequenz in allen diesen Introns der "PyXPuTPuAPy"-Regel relativ gut gehorcht.

Die vorliegende Arbeit kann für das Intron des *cob*-Gens aus *S. pombe* keine Aussage über die Lage des Lariatverzweigungspunktes treffen. Er muß relativ nahe am 3'-Ende des Introns lokalisiert sein, da elektronenmikroskopische Aufnahmen des Introns zirkuläre Moleküle zeigen. Der Verzweigungspunkt des Lariats für das 1. Intron des *cob*-Genes (Ib1) aus *S. cer.* liegt 7-8 Nukleotide vom 3'-Ende des Introns entfernt und paßt somit genau in die Auflistung der möglichen Verzweigungspunkte, die von Van der Veen et al. (1986) aufgestellt wurde (Schmelzer und Schweyen, Manuskript eingereicht). Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß auch beim *cob*-Intron aus *S. pombe* der Verzweigungspunkt an dieser Stelle, nämlich an dem konservierten Palindrom, lokalisiert ist.

In allen Gruppe II-Introns befindet sich in den für sie aufgestellten Sekundärstrukturmodellen der Introns das A, das am Verzweigungspunkt beteiligt sein könnte, in diesem Palindrom in einer ungepaarten Position. Es ist daher gut vorstellbar, daß dieses Adenosin, das keine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet, für eine kovalente Bindung zum 5'-ständigen Nukleotid des Introns frei ist.

Interessant wäre, durch Verwendung verschiedener spezifischer RNAsen und zweidimensionaler Auftrennung der erhaltenen RNA-Fragmente (siehe Ruskin et al., 1984) den Verzweigungspunkt basengenau zu bestimmen. Diese Methode würde vielleicht auch dazu beitragen, die unterschiedliche

Natur der zwei Introntranskripte (2500 b und 2300 b) zu identifizieren, falls ihre Unterschiedlichkeit auf der Benutzung verschiedener Verzweigungspunkte beruht.

Da alle bisher vorgenommenen Denkmöglichkeiten für einen Unterschied der beiden RNA-Moleküle durch verschiedenste Versuche sich als nicht zutreffend erwiesen haben, bleibt die Möglichkeit offen, daß die beiden Moleküle in verschiedener Lariat-Konfiguration vorliegen. Primer-Extension mit Intron-Primer nahe dem 5'-Ende des Introns konnte beweisen, daß die 5'-Enden beider Introns identisch sind und in eine Lariatbildung mit einbezogen sind. Es besteht nun die Möglichkeit, daß die beiden RNA-Moleküle verschiedene Lariats ausprägen. Somit würde eine verschiedene Lariatausbildung der Moleküle das unterschiedliche Laufverhalten bewirken. Die Ausbildung verschiedener Phosphodiesterbindungen und somit verschiedener Verzweigungspunkte ist aufgrund des Vorhandenseins verschiedener Sequenzen, die der PyXPuTPuAPy-Regel gehorchen, möglich. Die Beobachtung, daß es in den Introns durchaus mehrere Sequenzen gibt, die als Verzweigungspunkt dienen könnten, also mögliche "Branchpoint-Sequenzen" darstellen, wurde bereits von Ruskin et al.(1984), Zeitlin und Efstratiadis, (1984) und Keller und Noon (1985) gemacht. In der Arbeit von Reed und Maniatis (1985) wurden solche aktuellen und möglichen Verzweigungspunktsequenzen zusammengestellt. Die Autoren gehen davon aus, daß nur eine Sequenz ständig als Verzweigungspunkt dient und daß ein Alternieren der Verzweigungspunkte nicht stattfindet. Weiterhin nehmen sie an, daß die Sequenz, die am nächsten zum 3'-Ende des Introns liegt, als Lariatverknüpfungspunkt dient. So lassen sich auch für das cob-Intron aus *S. pombe* mehrere solche Sequenzen in der Umgebung des geschlossenen Leserahmens des Introns finden. Diese befinden sich an den Positionen 12904, 13240 und 13255 und haben die Sequenzen TCCTGAC, TGCTAAT und

TCTTAAT. Eine TACTAAC-Sequenz konnte auch unter diesen "möglichen" Sequenzen nicht gefunden werden.

Falls spezifische RNase-Behandlung die Hypothese bestätigen sollte, daß es in *S. pombe* Lariats mit verschiedenen Verzweigungspunkten gibt, so würde sich die Frage anschließen, wofür zwei identische Moleküle in verschiedener Konformation nötig sind, und welche unterschiedlichen Funktionen die beiden Moleküle ausüben. Hier könnte man die Cytochrom b-defekten Deletionsmutanten zum Vergleich heranziehen. Man könnte mit den gleichen Versuchen feststellen, ob die Intron-RNAs der Mutanten ebenfalls Lariatstruktur besitzen und ob die Verzweigungspunkte identisch sind zu den Lariats vom Wildtyp. Es ist nämlich durchaus möglich, daß die Intron-RNA-Moleküle der Mutanten eine andere Konfiguration besitzen als beim Wildtyp, obwohl sie im Harnstoff-Agarose-Gel etwa gleiche Laufgeschwindigkeit zeigen. Es ist nicht auszuschließen, daß sich eine Deletion innerhalb des Introns ebenso wie Deletionen an 5'- und 3'-Enden des Introns oder am Lariatverzweigungspunkt auf die Fähigkeit zur Lariatbildung auswirkt.

Ein anderer Versuch, der zur Beantwortung der Frage nach unterschiedlicher Lariatausprägung führen könnte, wäre die Behandlung der beiden isolierten Introntranskripte mit einem "Debranching-Extract" aus HeLa-Zellen (Ruskin und Green, 1985). Nach Behandlung mit diesem Extrakt würden beide Transkripte vollständig linearisiert vorliegen, da die 2'-5'-Phosphoesterbindung aufgelöst wäre. Würden beide Transkripte nach Debranching-Behandlung gleiches Laufverhalten in einem Gel zeigen, so kann man davon ausgehen, daß sich beide Moleküle durch verschiedene Lariatbildung (verschiedene Verknüpfungspunkte) unterscheiden. Zeigen sie unterschiedliches Laufverhalten, so unterscheiden sich bereits die linearen Formen voneinander; das würde bedeuten, daß dem 2300 b-Transkript Sequenzen fehlen, die das 2500 b-Transkript besitzt.

Das Auftreten zweier Introntranskripte

Der einzige Organismus, für den bisher eine ähnliche Situation bezüglich des Auftretens zweier Introntranskripte beschrieben wurde, ist *P. anserina*. Dieser Organismus besitzt für das *cox1*-Gen mehrere Introns, wobei das erste Intron zur Gruppe II gehört und einen offenen Leserahmen besitzt. Dieses Intron verhält sich bei alternierenden Kulturen wie ein Transposon, d.h. es verläßt das *cox1*-Gen und inseriert in das Kerngenom oder in andere Stellen des Mitochondriengenoms. Durch diese Neukombination verursacht es Seneszenz bei *Podospora*. Dieses Intron besitzt relativ hohe Homologie zum *cob*-Intron aus *S. pombe*. Wie auch bei *S. pombe* werden für das *cox1*-Intron aus *P. anserina* zwei Introntranskripte gebildet, die eine Länge von 2,5 und 2,7 kb besitzen. Diese sind somit etwas länger als die Introntranskripte aus *S. pombe*, weisen aber untereinander in Northern-Hybridisierungen die gleiche Längendifferenz wie die beiden *cob*-Intron-Transkripte aus *S. pombe* von ungefähr 200 b auf. Während das Konzentrationsverhältnis der Introntranskripte verglichen zum reifen Transkript bei *S. pombe* etwa 1:1 beträgt, werden die Introntranskripte bei *P. anserina* in ungefähr vierfacher Menge gegenüber dem reifen Transkript hergestellt. Die Tatsache, daß die Introntranskripte bei *S. pombe* in so hoher Konzentration hergestellt werden, daß sie bereits im EB-angefärbten Gel sichtbar sind, läßt den Schluß zu, daß diese beiden Transkripte für den Ablauf eines Prozesses, wie z. B. der RNA-Reifung, benötigt werden. Kück et al. (1985) können keine Aussagen treffen, inwiefern die beiden erhaltenen Transkripte bei *P. anserina* sich voneinander unterscheiden. Sie diskutieren verschiedene Initiationspunkte der Transkripte, wie sie auch bei dem später als Plasmid vorliegenden Intron auftreten (Wright und Cummings, 1983) oder die Möglichkeit der verschiedenen Konfiguration der RNA-Moleküle, d.h. lineares und zirkuläres Vorkommen des gleichen Transkriptes. Diese zweite Möglichkeit scheint den Autoren einleuchtend,

da das Vorkommen zirkulärer Intron-RNA Einfluß haben könnte auf den Mechanismus des Herausscheidens der Plasmid-DNA, die in alternierenden Zellen Seneszenz bewirkt. Die Möglichkeit des zirkulären bzw. linearen Auftretens der Intron-RNA wurde bei *S. pombe* bereits durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ausgeschlossen, ebenso wurde nachgewiesen, daß die 5'-Enden der beiden Transkripte identisch sind.

Selbstspleißende Introns

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Genen, bei denen es für das Processing ihrer Prä-RNA der Mithilfe von Enzymen und Cofaktoren bedarf, wurden einige RNA-Moleküle entdeckt, deren Reifung in vitro ohne Einwirkung von Proteinen und Cofaktoren möglich ist. Dieses Phänomen wurde zunächst bei dem Gruppe I-Intron-haltigen Gen der ribosomalen RNA (im Kern) aus *Tetrahymena* entdeckt (Cech et al., 1983; Ruskin et al., 1983). Es ist hier möglich, ohne Zugabe von äußeren Faktoren (außer rGTP und $MgCl_2$) das Intron der Prä-RNA zu exzisieren und die Exon-RNA-Anteile zu ligieren. Wegen seiner sozusagen enzymatischen Aktivität wurde das Intron als "Ribozym" bezeichnet. Solche Experimente waren auch erfolgreich beim ersten Intron des cob-Genes bei *N. crassa* (Garriga und Lambowitz, 1984) und dem Intron der großen ribosomalen RNA bei *S. cer.* (Van der Horst und Tabak, 1985), beide Introns der Gruppe I. Versuche, die für Gruppe II-Introns vorgenommen wurden, waren bisher nur für die beiden Introns erfolgreich, die als "Gruppe II-verwandt" bezeichnet wurden (Lang et al., 1985). Es sind dies das Intron 5 gamma aus dem *cox1*-Gen aus *S. cer.* (Van der Veen et al., 1986; Peebles, 1986) und das erste Intron aus dem cob-Gen aus *S. cer.* (Schmelzer und Schweyen, Manuskript eingereicht). Für das Intron 5 gamma konnte außerdem noch gezeigt werden, daß ribonukleo-GTP (rGTP) für erfolgreiches Prozessieren nicht nötig ist.

Bei beiden Introns wurde die Selbstsplicingreaktion unter veränderten Bedingungen, verglichen mit Tetrahymena, durchgeführt. Im Gegensatz dazu enthielt der in vitro-Transkriptionspuffer für Intron 5 gamma (cox1) und Intron 1 (cob) kein Spermidin. Dieses wurde erst zur Selbstsplicingreaktion zugegeben und hatte eine bis zu zehnmal höhere Konzentration wie zum Beispiel bei Van der Horst und Tabak (1985) beschrieben. Bei Standardbedingungen (Kruger et al., 1982; Guentier-Takada et al., 1983) verläuft die Autosplicingreaktion für Intron 5 gamma stark vermindert (R. Van der Veen, pers. Mitteilung), für Intron 1 aus cob ist sie nicht durchführbar (C.Schmelzer, pers. Mitteilung).

Versuche, die ein Selbstsplicing des cob-Introns aus *S. pombe* prüfen sollten, verliefen negativ. Sowohl unter Standardbedingungen als auch unter den modifizierten Bedingungen konnte ein Selbstsplicing für dieses Intron nicht gezeigt werden. Ebenso zeigte eine radioaktive Markierung mit rGTP nach in vitro Transkription negatives Ergebnis. Das bedeutet, daß für ein Splicing des cob-Introns kein rGTP, sondern offensichtlich (außerdem) mehrere andere, wahrscheinlich kernkodierte, Faktoren nötig sind. Diese Resultate könnten darauf hindeuten, daß für typische Gruppe II-Introns unter den beschriebenen Bedingungen ein in vitro Selbstsplicing nicht stattfindet.

Funktion des offenen Leserahmens des Introns im cob-Gen von *S. pombe*

Die vorliegende Arbeit kann keine Auskunft über die Funktion des offenen Leserahmens im cob-Gen bei *S. pombe* geben. Parallel zu diesem Intron gibt es in der Intron-Gruppe II noch drei weitere Vertreter, die einen offenen Leserahmen besitzen, der in Phase zum vorangegangenen Exon verläuft. Es sind dies Intron aI1 und aI2 aus cox1 von *S. cer.* und das Intron aus dem cox1-Gen von *P. anserina*. Die offenen Leserahmen dieser Introns haben für aI1 eine Länge von 2337 bp, für aI2 2445 bp (Bonitz et al., 1980) und für das cox1-Intron aus *Podospora* 2539 bp (Kück et al., 1985). Die Länge des ORFs

beim cob-Intron aus *S. pombe* beträgt 2424 bp; das bedeutet, daß die Kodierungskapazität in allen vier offenen Leserahmen ungefähr die gleiche ist.

Für das Intron aI1 wird die Ausbildung einer Maturase für sehr wahrscheinlich gehalten, d.h. Sequenzen des Introns werden translatiert, so daß ein Protein gebildet wird, das an der RNA-Reifung dieser cox1-RNA beteiligt ist (Carignani et al., 1983). Im Gegensatz dazu sprechen einige Hinweise dafür, daß das Intron des cox1-Genes aus *Podospora* eine andere Aufgabe zu erfüllen hat. Es wird angenommen, daß dieses Intron für eine reverse Transkriptase kodiert. In beiden Fällen handelt es sich um offene Leserahmen in Introns, die auf Aminosäureebene untereinander relativ gute Homologie zeigen. In den nächsten Abschnitten soll nun dargelegt werden, was für eine Maturasefunktion und was für eine reverse Transkriptasefunktion beim ORF des cob-Introns in *S. pombe* spricht und ob es möglich ist, daß diese beiden Funktionen von ein- und demselben Genprodukt übernommen werden können.

a) Kodieren die Intronsequenzen des cob-Gens bei *S. pombe* für eine reverse Transkriptase?

Dieser Frage sind Michel und Lang (1985) nachgegangen. Sie haben die Sequenzen der vier Leserahmenhaltigen Gruppe II-Introns (aI1, aI2 aus *S. cer.*, cox1-Intron aus *Podospora* und cob-Intron aus *S. pombe*) mit Sequenzen von RNA-abhängigen Polymerasen aus Retroviren und anderen viralen Genomen verglichen. Es handelte sich dabei um die Produkte des pol-Gens verschiedener Retroviren (Schwartz et al., 1983; Saigo et al., 1984) und entsprechende Proteine beim Cauliflowermosaicivirus (CaMV-Virus; Gardner et al., 1981) und bei Hepatitis b-Viren (Galibert et al., 1979). Für diesen Vergleich wurden zu den vier Gruppe II-Introns noch ein mitochondriales Plasmid aus *N. crassa* (Mauriceville-Plasmid; Nargang et al., 1984) herangezogen, das zu den Intron-ORFs gute Homologie zeigt.

Nargang et al. (1984) schreiben diesem Plasmid Eigenschaften ähnlich einem Transposon zu.

Michel und Lang fanden bei ihren Vergleichen, daß jede der sieben Domänen der Proteine sowohl in den möglichen Proteinen der Introns als auch in den Proteinen der Viren ausgeprägt war, und daß sogar die Reihenfolge der Domänen die gleiche war. Die vier offenen Leserahmen der Gruppe II-Introns fügten sich erstaunlich gut in diesen Vergleich ein. Daher nehmen die Autoren an, daß die möglicherweise von den Intron-ORFs hergestellten Proteine zu einigen RNA-abhängigen Polymerasen verwandt sind, wie sie bei Retroviren und Transposons gefunden werden. Retroviren, die sich dadurch auszeichnen, daß ihr Genom aus einzelsträngiger RNA besteht, sind durch ihre RNA-abhängige Polymerase, auch reverse Transkriptase genannt, in der Lage, ihre RNA in einzelsträngige DNA umzuschreiben. Dieses Enzym ist außerdem in der Lage, einen zu dieser einzelsträngigen DNA komplementären DNA-Strang zu synthetisieren, so daß ein DNA-Doppelstrang entsteht. Dieser kann dann nach Eindringen des Virus in die Wirtszelle in das Wirtsgenom integriert werden, wo die Virus-DNA transkribiert und translatiert wird (Hüllproteine und reverse Transkriptase des Virus werden hergestellt). Wenn ein solcher Mechanismus für Gruppe II-Introns vorliegen sollte, so würde das bedeuten, daß der ORF des Introns für eine reverse Transkriptase kodiert; einen Hinweis darauf zeigt der Aminosäurevergleich der Intron-ORFs mit Retrovirenprotein: 9 von 10 Aminosäureresten, die nach Toh et al. (1983) bei allen verglichenen RNA-abhängigen Polymerasen von Viren invariant sind, konnten auch bei vier der fünf untersuchten Sequenzen gefunden werden (Ausnahme: Mauriceville-Plasmid zeigt nur 8 von 10 Aminosäuren als konserviert.).

Einen weiteren Hinweis auf die Existenz einer reversen Transkriptase in mitochondrialen Pilzgenomen liefern eine Anzahl von Intronmutanten im cob-Gen von *S. cer.*, die revertieren können, indem sie das betroffene

Intron und auch benachbarte Introns durch präzise Exzision eliminieren (Gargouri et al., 1983). So kann eine Mutante im ersten Intron des cob-Gens von *S. cer.* durch Deletion dieses Introns zum Wildtyp-Phänotyp revertieren. Mutanten im 2. Intron des cob-Gens können diese Reversion durch Deletion von Intron 1 und 2 oder Intron 1, 2 und 3 hervorrufen, während eine Mutante im 3. Intron des cob-Gens Intron 1, 2 und 3 eliminieren kann.

Die Autoren ziehen ebenfalls in Betracht, daß ein Mechanismus ähnlich der reversen Transkriptase für dieses Phänomen verantwortlich sein könnte. Eine reife oder teilweise gespleißte RNA könnte der reversen Transkriptase als Vorlage gedient haben, die diese dann in eine cDNA umgeschrieben hat. Dann könnte durch Rekombination der Original-DNA mit der cDNA die Original-DNA verkürzt worden sein, d.h. die Introns wurden somit exzisiert. Solche Mechanismen wurden auch in höheren Eukaryonten beobachtet, wobei solche Ereignisse eher Pseudogene als funktionsfähige Wildtypgene hervorgerufen haben (Wild et al., 1982; Nishioka et al., 1980). Reversion durch Intronexzision konnte auch für *S. pombe*-Mutanten beobachtet werden. Hier war es möglich, Revertanten zu einer Mutante mit Deletion im *cox1*-Intron 2 zu erhalten, die ebenfalls das gesamte Intron herausgeschnitten hatten (Merlos-Lange, Dissertation in Vorber.). Außerdem gibt es die natürliche Stammvariante *S. pombe* EF1, die kein Intron im cob-Gen besitzt.

Ein dritter wichtiger Punkt, der für die Anwesenheit einer reversen Transkriptaseaktivität spricht, ist das Seneszenzverhalten von *P. anserina*. Wie bereits erwähnt, wird bei alternden Kulturen dieses Organismus ein mit Plasmid gebildet, dessen Ursprung das erste Intron des *cox1*-Genes ist; dies enthält alle Sequenzen dieses Introns. Steinhilber und Cummings (1985) konnten reverse Transkriptaseaktivitäten für *Podospora* nachweisen und messen. Die Enzymaktivität tritt nur in alternden Zellen auf und kann

daher klar unterschieden werden von einer zweiten Aktivität der DNA-Polymerase, die nur in Lysaten von Zellextrakten sowohl junger als auch alternden Zellen gefunden wurde. Die reverse Transkriptaseaktivität wurde mit Kaninchen-Globin-RNA als Vorlage getestet und zeigte auch hier ihre Funktion. Die Autoren haben noch keine Gewißheit, wo die Enzymaktivität im Mycel lokalisiert ist. Sie nehmen aber wegen der Untersuchungen von Michel und Lang (1985) an, daß der ORF des *cox1*-Introns dieses Protein kodiert. Ob nun ein solcher Mechanismus für *S. pombe* vorliegt, worauf die Homologiestudien von Michel und Lang (1985) hindeuten, könnte man klären, indem man versucht, dieses Intron als Protein zu exprimieren. Hierfür müßten zunächst die intronspezifischen Codons, die im universellen Code "Stop" bedeuten (z.B. UGA im Intron bedeutet *trp*), durch gezielte Mutationen ausgetauscht werden. Nach *lacZ*-Fusion und Ligation in ein bakterielles Plasmid kann dieses in *E. coli* eingebracht werden. Es müßte dann ein Hybridprotein aus β -Laktamase und dem *cob*-Intron gebildet werden. Dies könnte man durch Anbieten externer RNA-Moleküle auf seine Funktion testen.

b) Wird durch das Intron eine Maturase kodiert?

Da das *cob*-Gen aus *S. pombe* relativ gute Homologien zu den beiden ersten Introns aus *cox1* von *S. cer.* zeigt, liegt die Vermutung nahe, daß für die RNA-Reifung gleiche Mechanismen zuständig sind. Für das 1. Intron aus *cox1* gibt es starke Hinweise für die Existenz einer Maturase. Hier kodieren die Sequenzen des Introns für ein solches Protein, das dann am Spleißen der Präkursor-RNA, d.h. am Schneiden der Vorläufer-RNA und Ligieren der Exon-RNA-Anteile beteiligt ist (Carignani et al., 1983). Dieser Maturase werden demnach zwei Funktionen bei der RNA-Reifung zugeordnet.

Es gibt auch andere Introns, die für Maturasas kodieren, z. B. das zweite, dritte und vierte Intron des *cob*-Gens, sowie Intron 5 alpha und 5 beta des

cox1-Gens. Einen direkten Nachweis der Existenz einer Maturase haben bisher nur Jacq et al. (1984) für die cob-Intron 4-Maturase angetreten. Sie haben Sequenzen dieses Introns (vom offenen Leserahmen) mit dem Ende des lacZ-Gens verbunden, dies unter die Kontrolle eines Lambda-Promoters gestellt und in *E. coli* exprimiert. Das Hybridprotein, die "Beta-Galaktosidase-mRNA-Maturase", wurde in Kaninchen gespritzt, die gegen dieses Protein Antikörper produzierten. Die Antikörper wurden mit mitochondrialen Proteinen aus *S. cer.* immunpräzipitiert. Für Mutanten, die diese Maturase zum Teil in verkürzter Form, jedoch meist in sehr viel höherer Konzentration herstellen als der Wildtyp, wurde jeweils eine bestimmte charakteristische Bande gefunden, die mit dem zugegebenen Antikörper immunpräzipitierte. Der Wildtyp scheint die Maturase in so geringer Menge herzustellen, daß ihre Konzentration unter der mit Immunpräzipitation erfaßbaren Menge liegt.

Die Idee, daß manche Introns für eine Maturase, d.h. ein Protein kodieren, das an der Reifung der mRNA beteiligt ist, kam durch die Beobachtung, daß sich Mutanten, deren Mutation in diesen Introns lag, unterschiedlich verhielten. Es gab zwei Typen von Mutanten, die sich nach Kreuzen mit haploiden Stämmen, deren Intronsequenz zwar intakt war, die jedoch eine Mutation in nachfolgenden Exons oder Introns und somit auch cob⁻-Phänotyp besaßen, im Phänotyp der Zygote voneinander unterschieden. Die Zygoten der sogenannten "cis-dominanten" Stämme blieben nach Kreuzung weiterhin atmungsdefekt, die "trans-rezessiven" waren nach Kreuzung in der Lage zu atmen. Das bedeutet, daß die intakte Intronsequenz, die durch den Kreuzungspartner eingeführt wurde, zu einem Produkt translatiert wurde, das dann an der Exzision des Introns der mutierten RNA beteiligt war. Dieses mutierte Intron konnte somit wieder herausgeschnitten werden, die Transkriptreifung konnte wieder bis zur reifen mRNA erfolgen, so daß ein intaktes Protein (Cytochrom b oder

Cytochromoxidase) hergestellt werden konnte. Dies führte dann zur Atmungskompetenz.

Dagegen blieben die Zygoten der cis-dominanten Mutanten weiterhin atmungsdefekt. Das bedeutet, daß die Maturase, die vom nicht mutierten Allel hergestellt wird, das mutierte Intron nicht exzidieren kann. Die Mutation im Intron liegt so, daß sie bestimmte Sekundärfaltstrukturen des Introns nicht mehr zuläßt. Dies verhindert dann das Herausschneiden, obwohl die Maturase anwesend ist. Dies deutet darauf hin, daß die Sekundärstruktur der RNA, wie schon erwähnt, eine entscheidende Rolle in der RNA-Reifung spielt. Daher kann auch durch kompensatorische Basenaustausche und Wiederherstellung der Sekundärstruktur erreicht werden, daß eine Mutante wieder atmungskompetent wird.

Die Existenz einer Maturase im ORF-haltigen cob-Intron von *S. pombe* ist denkbar, da Untersuchungen an mitochondrialen Deletionsmutanten und ihr Phänotyp darauf hinweisen. So ist keine der Intronmutanten, die im ORF des Intron deletiert ist (diu145, diu123, Sp49b, Sp272, EB9), mehr fähig, beide Introntranskripte (2500 b und 2300 b) wie im Wildtyp zu prozessieren. Alle diese Mutanten häufen RNA-Präkursoren an. Mit den Deletionen scheint eine Fähigkeit verlorengegangen zu sein, die im Wildtyp den Reifungsschritt vom 2500 b- zum 2300 b-Transkript bewirkt.

Vergleicht man das Sekundärstrukturmodell der Intron-RNA (Lang et al., 1985) mit den Deletionsorten der Mutanten, so kann man feststellen, daß außer der Mutante diu145 keine der Deletionen in den konservierten und gepaarten Sequenzen des Sekundärstrukturmodells liegt. Vielmehr sind sie alle in dem großen Loop lokalisiert, der 475 b vom 5'-Ende des Introns entfernt beginnt und etwa 1890 b enthält. Verglichen mit der Einteilung der Mutanten bei *S. cer.* müßte es sich bei diesen Mutanten um trans-rezessive handeln, d.h. sie müßten durch das Genprodukt eines "gesunden" Allels komplementierbar sein.

(Die Lokalisation der Deletion von Mutante diu145 im Sekundärstrukturmodell wird in Abb. 33 gezeigt.)

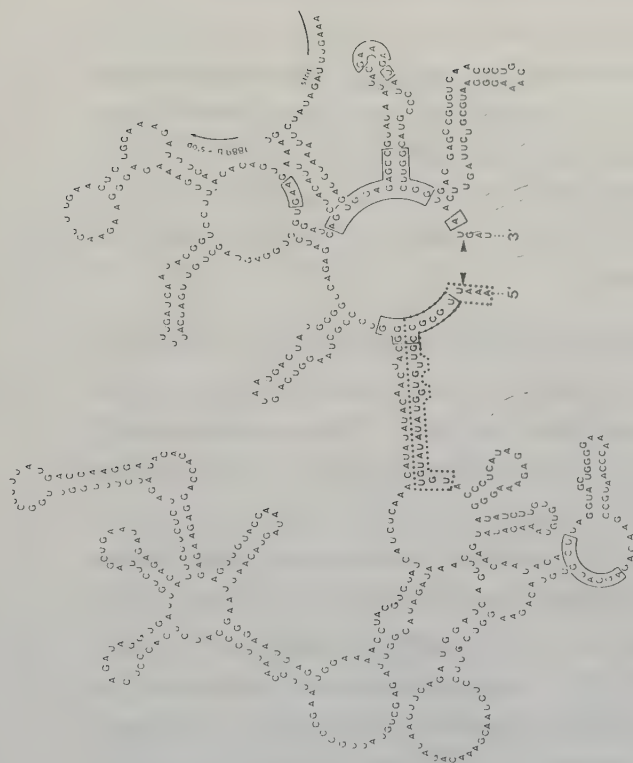


Abb. 33: Lage der Deletion der Mutante diu145 im RNA-Sekundärstrukturmodell

(Das Sekundärstrukturmodell stammt aus der Arbeit von Lang et al., 1985)

Aus den bisherigen Untersuchungen läßt sich die Forderung ableiten, daß zur Ligation der beiden Exon-RNA-Anteile des cob-Gens außer dem 2300 b-Transkript noch ein anderer Faktor beteiligt sein muß, da auch die Exonmutanten kein Ligationsprodukt aus Exon 1 und Exon 2 herstellen können, obwohl sie eine 2300 b-RNA synthetisieren können.

Ein Versuchsansatz für den Nachweis der Existenz einer Maturase bei cob von *S. pombe*, ähnlich wie bei Jacq et al. (1985) ist für das cob-Intron aus *S. pombe* relativ schwierig. Dieses Intron besitzt nämlich einige UGA-Codons, die im mitochondrialen Code Tryptophan, im universellen Code jedoch Stop bedeuten. Um Expression in *E. coli* nach Ligation an das lacZ-Gen zu erreichen, müßte man durch in vitro-Mutagenese diese UGA-Codons entfernen.

Abschließend soll die Frage angesprochen werden, ob es möglich sein kann, daß so homologe Introns wie die vier leserahmenhaltigen Introns der Gruppe II voneinander völlig verschiedene Funktionen innehaben können.

Michel und Lang (1985) sehen die Möglichkeit, daß die Maturase, die z. B. von Intron al1 gebildet wird, zu reversen Transkriptasen verwandt ist, nicht als Widerspruch. Sie sind der Meinung, daß Maturasen eher eine zusätzliche Einrichtung sind (verglichen damit, daß es Introns gibt, die keine zusätzlichen Faktoren für ihre Exzision benötigen), und daß sich eine Maturaseaktivität aus intronassoziierten Proteinen als eine Form der Selbstregulation entwickelt haben könnte. Andererseits könnte der Besitz einer reversen Transkriptase, auch wenn sie normalerweise in den Organellen nicht gebraucht wird, von entscheidendem Vorteil für die Erhaltung und Verbreitung strukturierter Introns in Organellen gewesen sein.

Es ist nicht auszuschließen, daß sich die Maturaseaktivität aus einer reversen Transkriptaseaktivität entwickelt hat. Es ist möglich, daß im Lauf der Selbstregulation des Spleißprozesses dieses Protein, die Maturase, entwickelt hat. Andererseits ist die Vorstellung, daß bei der

Reversion von Mutanten durch Intronexzision eine reverse Transkriptase beteiligt ist, nicht abwegig. Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß zwei so unterschiedliche Funktionen von ein- und demselben Gen kodiert werden sollen.

Mutante diu145 ist am 5'-Spleißpunkt deletiert

Untersuchungen an der Mutante diu145 ermöglichten es, Erkenntnisse über kryptische Spleißpunkte zu erhalten. Diese Mutante trägt eine Deletion von 46 bp, die den 5'-Spleißpunkt des Introns überstreicht. Da diese Mutante in der Lage ist, zumindest das größere der beiden Introntranskripte herzustellen, muß sie dieses Transkript aus der Präkursor-RNA ausschneiden können. Da jedoch der Wildtyp-Spleißpunkt deletiert ist, kann diese Mutante offensichtlich einen oder mehrere kryptische Spleißpunkte aktivieren und so eine neue Schnittstelle schaffen.

S1-Nuklease- und Primer-Extension-Experimente ergaben Hinweise darauf, daß sich die neuen Spleißstellen in 5'-Richtung zum Originalspleißpunkt befinden, d.h. im 1. Exon liegen. Das bedeutet, daß die Intron-RNA dieser Mutante geringe Anteile an Exon1-Sequenzen enthält. Daß die Mutante mehrere Spleißpunkte verwendet, legen die S1-Experimente nahe, da hier mehrere Signale im Intron- und Exonbereich zu sehen waren. Primer-Extension-Versuche konnten zeigen, daß es mindestens drei kryptische Spleißstellen gibt, die 66 b, 123 b und etwa 170 b in 5'-Richtung vom Original-Spleißpunkt entfernt liegen. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß auch Spleißpunkte aktiviert wurden, die näher als 66 Nukleotide vom Original-Spleißpunkt entfernt liegen.

Mutante diu145 ist eine von zwei bisher beschriebenen Hefemutanten, die am Spleißpunkt mutiert sind und trotzdem in der Lage sind, durch Benutzung kryptischer Spleißpunkte die Intronsequenz aus der Präkursor-RNA herauszuschneiden.

Bei der anderen der eben erwähnten Mutanten handelt es sich um Mutante G2457 aus *S. cer.* (De la Salle et al., 1982); sie betrifft das Intron 4 des *cob*-Genes. Diese Mutante besitzt nur einen einzigen Basenaustausch 2bp vor dem 5'-Spleißpunkt des 4. Introns, d.h. dieser Basenaustausch betrifft das vorletzte Nukleotid des 4.Exons. Diese Mutation bewirkt atmungsdefekten Phänotyp. Mutante G2457 häuft einerseits Präkursor-Cytochrom b-RNA an, andererseits findet man ein Transkript von 2,2 Kb Länge, das nahezu der Länge der reifen *cob*-mRNA entspricht (Perea und Jaqc, 1985). Da die Mutante jedoch atmungsdefekt ist, muß diese reife mRNA so verändert sein, daß kein funktionsfähiges *cob*-Protein mehr hergestellt werden kann. Ein solches funktionsfähiges Protein konnte auch nicht durch Spektroskopie nachgewiesen werden, jedoch ein verkürztes Protein, das entstanden sein könnte, wenn man annimmt, daß die Benutzung eines neuen Spleißpunktes nahe dem Originalspleißpunkt zur Leserasterverschiebung führt und die Translation am nächstmöglichen Stopcodon abbricht. Die Mutante aktiviert ebenfalls mehrere neue Spleißpunkte, da Primer-Extension-Versuche mit einer DNA-Vorlage aus Exon 5 und 6 (ohne Intron 5!) und der "reifen" Mutanten-RNA ab dem 3'-Ende des Exons 4 ein mehrdeutiges Muster zeigen; das beweist, daß an diesem Punkt kein homologes Spleißen stattgefunden hat, sondern, daß verschiedene Spleißpunkte verwendet wurden.

Diese Mutante, wie auch die Mutante *diu145* aus *S. pombe* stellen einen neuen Typ spleißdefekter mitochondrialer Mutanten dar. Für *S. cer.* sind andere spleißdefekte Mutanten völlig im Herausschneiden zumindest des mutierten Introns blockiert. Beide beschriebenen Mutanten häufen zwar, wie auch die völlig blockierten Mutanten aus *S. cer.* Präkursor-RNA an, die zumindest das betroffene Intron noch enthält, außerdem sind sie in der Lage, zu einem geringeren Teil gespleißte mRNA (G2457) oder zumindest eine stabile Intron-RNA (*diu145*) herzustellen. Der Unterschied der beiden Mutanten bezüglich ihrer Fähigkeit der RNA-Prozessierung liegt darin, daß

Mutante G2457 außer dem Herausschneiden des Introns noch in der Lage ist, die Exonanteile der mRNA zu ligieren, während Mutante diu145 nur noch die Intron-RNA herauszuscheiden vermag. Für Mutante diu145 wurde kein reifes cob-Transkript gefunden, was bedeutet, daß es entweder nicht hergestellt oder sehr schnell abgebaut wird, da es wegen der Veränderung am 3'-Ende des 1. Exons instabil geworden ist.

Während diese zwei beschriebenen Mutanten die einzigen in vivo-Beispiele für die Benützung kryptischer Spleißpunkte in mitochondrialer RNA darstellen, wurden in vitro-Versuche am Beta-Globin unternommen, die zeigen sollen, wie sich eine Mutation am 5'-Spleißpunkt dieses Gens auf die Präkursor-mRNA-Reifung auswirkt. Treisman et al. (1983) untersuchten verschiedene klonierte Beta-Globin-Gene, bei denen einzelne Basenaustausche nahe dem 5'-Spleißpunkt des 1. Introns vorgenommen wurden, auf ihre Fähigkeit des in vitro-Spleißens.

Während Mutation (1) (die drei beschriebenen Mutationen werden der Einfachheit halber mit (1), (2) und (3) bezeichnet) mit einem Basenaustausch am 1. Nukleotid des 1. Introns (G→A) eine völlige Inaktivierung des Original-Spleißpunktes zur Folge hat, wird dessen Aktivität bei Mutationen (2) und (3) (Basenaustausch G→C am 5. Nukleotid bzw. T→C am 6. Nukleotid des 1. Introns) lediglich reduziert. Bei allen drei Mutationen ist festzustellen, daß sie drei neue kryptische Spleißstellen aktivieren, die für alle drei Mutationen identisch sind. Sie befinden sich von der Originalspleißstelle aus betrachtet 13 bp in 3'-Richtung (Intron), 16 bp und 38 bp in 5'-Richtung (1. Exon). Diese neuen Spleißstellen beinhalten - wie die Originalstelle - GT-Nukleotide, die bei Kerngenen als wichtiges Charakteristikum einer Spleißstelle gelten. Es ist denkbar, daß die snRNA U1, die die 5'- und 3'-Spleißstellen zusammen bringen soll (Lerner et al., 1980; Rogers et al., 1980), mit der 5'-Spleißstelle durch ihre Mutation eine weniger stabile Paarung eingehen kann, und die neuen 5'-Spleißstellen eine energetisch günstigere Paarung zulassen.

Treisman et al. (1983) zeigen mögliche Paarungsinteraktionen der neuen, originalen und mutierten 5'-Spleißstellen mit der snRNA U1 auf; aus diesen Aufstellungen ist ersichtlich, daß die kryptischen Spleißstellen im Vergleich zu den mutierten Original-Spleißstellen bessere Paarungen zulassen und somit die Verwendung einer Spleißstelle davon abhängt, wie günstig die Paarungsverhältnisse der 5'- und 3'-Spleißstellen mit der snRNA sind. Außer diesen energetisch günstigen Paarungen, d.h. den entsprechenden Nukleotidsequenzen müssen jedoch auch andere Faktoren für die Aktivierung einer Spleißstelle von Bedeutung sein, da Treisman et al. (1983) zeigen konnten, daß nicht alle für eine Faltung möglichen Sequenzen auch als Spleißstelle in Frage kommen. Sie nehmen an, daß die Sekundärstruktur der RNA und/oder Wechselwirkungen der RNA mit Protein von Bedeutung sind.

Mutationen (2) und (3) (siehe letzter Abschnitt) wurden auch an Patienten festgestellt. Dadurch, daß durch diese Mutationen der Original-Spleißpunkt nicht völlig inaktiviert, sondern seine Aktivität lediglich reduziert wird, wird bei diesen Patienten doch noch ein geringer Teil normalen Beta-Globins gebildet. Die Konzentration dieses normalen Beta-Globins ist bei Patienten mit Mutation (3) höher als bei Mutation (2), so daß bei Patienten mit Mutation (2) eine schwerere Anämie vorliegt als bei denen mit Mutation (3) (Orkin und Kazasian, unveröffentlichte Daten, zitiert in Treisman et al., 1983).

Reed und Maniatis (1985) zeigen durch in vitro-Versuche den Einfluß verschiedener Mutationen auf die Ausbildung eines Intron-Lariat-Moleküles. Sie untersuchten unter anderem eine Mutation des 5'-Spleißpunktes des ersten Introns des Beta-Globin-Genes auf Spleißfähigkeit und Lariatbildung. Die untersuchte Mutation wurde durch einen Basenaustausch am Ende des ersten Exons kreiert. Dieser bewirkte die Bildung eines neuen Spleißpunktes, der 16 bp in 5'-Richtung (= 1. Exon) gelegen war. Dieser neue Spleißpunkt ist in der Lage, ein Lariatmolekül

auszubilden und verwendet den Original-Verzweigungspunkt der Intronsequenz zur Ausbildung der Phospho-2'-5'-esterbindung.

Eine Aussage über Lariatbildung bei Mutante diu145 ist nicht möglich. Zum einen hat das Intron-RNA-Molekül dieser Mutante gleiche Länge im Agarose-Harnstoffgel wie die Wildtyp-Intron-RNA. Zum anderen zeigen Primer-Extension-Versuche kein Stoppsignal an möglichen neuen 5'-Spleißstellen. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß diese Mutante, die im Gegensatz zu anderen Spleißstellen-Mutanten eine Deletion von 46 bp besitzt, diese Deletion ohne weiteres "ausgleichen" und ein Lariatmolekül bilden kann.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung der Transkriptreifung am cob-Gen von *S. pombe* 50 und Deletionsmutanten brachte folgende Ergebnisse:

Das Primärtranskript des cob-Gens hat eine Länge von etwa 4000 b und umfaßt außer den Exon- und Intronsequenzen eine Leader- und Trailerregion. Das reife cob-Transkript umfaßt Leader- und Trailerregion, sowie die Exonsequenzen. Für das Intron werden zwei Transkripte (Gruppe II) gebildet, die 2500 b und 2300 b lang sind und die in stabiler Form vorliegen. Ihre Konzentration ist so hoch, daß die Transkripte bereits im EB-angefärbten Gel sichtbar sind. Diese Intron-RNAs liegen als Lariats vor. Im Laufe der Transkriptreifung wird zudem ein Transkript hergestellt, das etwa 100 Nukleotide der 3'-seitigen Sequenzen des Introns und Teile des Exon 2 (oder Gesamt-Exon 2) enthält.

Untersuchungen auf den Ursprung der Verschiedenheit der beiden Introntranskripte schließen Verkürzungen an den RNA-Flanken oder inmitten der Moleküle aus. Ebenso konnte gezeigt werden, daß der Grund der Unterschiedlichkeit nicht in verschiedener Sekundärstruktur der Moleküle liegt. Es liegt die Vermutung nahe, daß *S. pombe* zwei Transkripte mit unterschiedlicher Lariatstruktur ausbildet.

Die Mutanten stellen Präkursormoleküle für das cob-Gen her. Abhängig von der Lokalisation der Deletion verfügen die Mutanten über unterschiedliche Fähigkeit, beide Introntranskripte zu prozessieren. Mutanten mit Deletion im Exon können wie der Wildtyp beide Intron-RNAs herstellen. Mutanten mit Deletionen an den Intronflanken sowie die Mutante mit Deletion am 5'-Spleißpunkt können nur das größere der beiden Transkripte herstellen. Mutanten innerhalb des Introns können kein in Northern-Analysen sichtbares Introntranskript mehr herstellen. Alle Mutanten synthetisieren das Transkript mit Intron- und Exon 2-Anteilen, jedoch ist keine Mutante in der Lage, Exon 1- mit Exon 2-Sequenzen zu ligieren. Da weder die

Mutanten mit Deletion im Exon noch solche mit Deletion im Intron in der Lage sind, die Exontranskripte zu ligieren, so läßt dies den Schluß zu, daß für ein einwandfreies Spleißen der Präkursor-RNA sowohl Sequenzen des Exons als auch des Introns nötig sind.

Mutante diu145 mit Deletion des 5'-Spleißpunktes ist in der Lage, das größere der beiden Introntranskripte herzustellen. Es konnte gezeigt werden, daß die Mutante mehrere kryptische Spleißpunkte aktiviert, die 5'-seitig des Original-Spleißpunktes liegen. Primer-Extension-Versuche haben gezeigt, daß die Intron-RNA dieser Mutante Sequenzen des 1. Exons enthält.

Vielen Dank!

An den Betreuer dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. K. Wolf, für seine stete Bereitschaft zu Diskussionen, für wertvolle Hinweise und Ratschläge und seine Hilfsbereitschaft bei der Entstehung dieser Arbeit;

an Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Genetik und Mikrobiologie;

an Herrn Dr. H. F. Tabak, der mir einen dreimonatigen Aufenthalt in seinem Labor in Amsterdam ermöglichte, um neue biochemische Methoden zu lernen;

an Frau G. Van der Horst, die mich im Labor von Dr. Tabak mit den Techniken der Primer-Extension und der in vitro-Transkription vertraut gemacht hat;

an Herrn Dr. H.-J. Fritz aus dem Institut für Biochemie, Martinsried, Herrn Dr. H. Domdey aus dem Genzentrum, Martinsried und Herrn Prof. Dr. Boom aus Leiden/Niederlande, für die Überlassung von synthetischen Oligonukleotiden und wertvolle Tips für die Durchführung verschiedener Versuche, sowie hilfreiche Diskussionen;

an Frau Dr. A. C. Arnberg für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der RNA, sowie die Überlassung von Photographien;

an die DFG für die finanzielle Unterstützung von März 1983 bis Dezember 1985 und EMBO für die Finanzierung des dreimonatigen Aufenthaltes im Labor von Dr. Tabak;

an meine Kollegen Dr. F. Ahne und Dr. H. Trinkl, die durch ihre Aufgeschlossenheit und Hilfsbereitschaft ein Arbeiten in angenehmer Atmosphäre möglich machten

und nicht zuletzt an alle Mitarbeiter des Institutes, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Diskussionen zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahne, F. (1985). Dissertation, Universität München.
- Ahne, F., Merlos-Lange, A.-M., Lang, B. F. und Wolf, K. (1984). *Curr. Genet.* 8, 517-524.
- Alwine, J. C., Kempe, D. J., Parker, B. A., Reiser, J., Renart, J., Stark, G. R. und Wahl, G. M. (1979). *Meth. Enz.* (Wu, R. ed.) 68, 220-242; Acad. Press, New York.
- Anziano, P. Q., Perlman, P. S., Lang, B. F. und Wolf, K. (1983). *Curr. Genet.* 7, 273-284.
- Bailey, J. M. und Davidson, N. (1976). *Anal. Biochem.* 70, 70-85.
- Bernardi, G. und de Zamaroczy, M. (1985). *Gene* 37, 1-17.
- Birnboim, M. G. und Doly, J. (1979). *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bonitz, S. G., Coruzzi, G., Thalenfeld, B. E. und Tzagoloff, A. J. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 11927-11941.
- Bonitz, S. G., Homison, G., Thalenfeld, B. E. und Tzagoloff, A. J. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 6268-6274.
- Bonnard, G., Michel, F., Weil, H. J. und Steinmetz, A. (1984). *Mol. Gen. Genet.* 194, 330-336.
- Burger, G. und Werner, S. (1985). *J. Mol. Biol.* 186, 231-242.
- Butler, E. T. und Chamberlin, M. J. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 5772-5778.
- Carignani, G., Groudinski, O., Frezza, D., Schiavon, E., Bergantino, E. und Slonimski, P. P. (1983). *Cell* 35, 733-742.

- Cech, T. R., Zaugg, A. J. und Grabowski, P. J. (1981). *Cell* 27, 487-496.
- Church, G. und Gilbert, W. (1980). In: *Mobilization and Reassembly of Genetic Information* (eds. Joseph, D. R., Schultz, J., Scott, W. A. und Werner, R.) pp 379-395 (Academic Press, New York).
- Clayton, D. A. (1984). *Ann. Rev. Biochem.* 53, 573-594.
- Crick, F. (1979). *Science* 204, 264-271.
- Daniels, C. J., Gupta, R. und Doolittle, W. F. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 3132-3134.
- Davies, R. W., Waring, R. B., Ray, J. A., Brown, T. A. und Scazzocchio, C. (1982). *Nature* 300, 719-724.
- De la Salle, H., Jacq, C. und Slonimski, P. P. (1982). *Cell* 28, 721-732.
- Domdey, H., Apostel, B., Lin, R. J., Newman, A., Brody, E. und Abelson, J. (1984). *Cell* 39, 611-621.
- Dujon, B. (1980). *Cell* 20, 185-197.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P. und Charney, P. (1979). *Nature* 281, 646-650.
- Gardner, R. C., Howarth, A. J., Hahn, P., Brown-Luedi, M., Sheperd, R. J. und Messing, J. (1981). *Nucl. Acids Res.* 9, 2871-2888.
- Gargouri, A., Lazowska, J. und Slonimski, P. P. (1983). In: *Mitochondria 1983* (Schweyen, R. J., Wolf, K. und Kaudewitz, F. eds.) pp 259-268, Walter de Gruyter, Berlin-New York.
- Garott, H. und Ansorge, W. (1981). *Anal. Bioch.* 115, 450-457.
- Garriga, G. und Lambowitz, A. M. (1984). *Cell* 38, 631-641.

- Gloves, D. M. und Hogness, D. S. (1977). *Cell* 10, 167-176.
- Goodman, H. M., Olson, M. V. und Hall, B. D. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5453-5461.
- Greer, C. L. und Abelson, J. (1984). *TIBS* 9, 139-141.
- Grivell, L. A. und Borst, P. (1982). *Nature* 298, 703-704.
- Grivell, L. A., Bonen, L. und Borst, P. (1983). In: *Genes, Structure and Expression*, Kroon, A. M. ed., pp279-306, Wiley Chichester.
- Guerrier-Takada, C., Gardnier, K., Marsh, T., Pace, N. und Altman, S. (1983). *Cell* 35, 849-857.
- Guiso, N., Dreyfuss, M., Siffert, G., Danchin, A., Spyridakis, A., Claisse, M. und Slonimski, P. P. (1984). *EMBO J.* 3, 1769-1772.
- Hardy, S. F., Grabowski, P. J., Padgett, R. A. und Sharp, P. A. (1984). *Nature* 308, 375-377.
- Hernandez, N. und Keller, W. (1983). *Cell* 35, 89-99.
- Heyting, C., Meijlink, F. C. P. W., Verbert, M. P., Sanders, J. P. M. und Borst, P. (1979). *Mol. Gen. Genet.* 168, 231-250.
- Jacq, C., Lazowska, J. und Slonimski, P. P. (1980). *C. R. Acad. Sci., Paris, Ser. D.* 290, 89-92.
- Jacq, C., Banroques, J., Becam, A. M., Slonimski, P.P., Guiso, N. und Danchin, A. (1984). *EMBO J.* 3, 1567-1572.
- Kassavetis, G. A., Butler, E. T., Roulland, D. und Chamberlin, M. J. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 5779-5788.
- Kaine, P., Gupta, R. und Woese, C. R. (1983). *Proc. Natl. Sci. USA* 80, 3309-3312.

- Keller, E. B. und Noon, W. A. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7417-7420.
- Keller, W. (1984). *Cell* 39, 423-425.
- Krainer, A. R., Maniatis, T., Ruskin, B. und Green, M. R. (1984). *Cell* 36, 993-1005.
- Krieg, P. A. und Melton, D. A. (1984). *Nukl. Acids Res.* 12, 7057-7070.
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E. und Cech, T. R. (1982). *Cell* 31, 147-157.
- Kück, U., Ossiewacz, H. D., Schmidt, U., Kappelhoff, B., Schulte, E., Stahl, U. und Esser, K. (1985). *Curr. Genet.* 9, 373-382.
- Lang, B. F. (1984). *EMBO J.* 3, 2129-2136.
- Lang, B. F., Ahne, F. und Bonen, L. (1985). *J. Mol. Biol.* 184, 353-366.
- Lang, B. F., Ahne, F., Distler, S., Trinkl, H., Kaudewitz, F. und Wolf, K. (1983). In: *Mitochondria 1983* (Schweyen, R. J., Wolf, K. und Kaudewitz, F. eds.), pp 313-329, Walter de Gruyter, Berlin-New York.
- Lang, B. F., Burger, G., Doxiadis, J., Thomas, D. Y., Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1977). *Anal. Bioch.* 72, 110-121.
- Lang, B. und Wolf, K. (1984). *Mol. Gen. Genet.* 196, 466-472.
- Langford, C. J. und Gallwitz, D. (1983). *Cell* 33, 519-527.
- Lazowska, J., Jacq, C. und Slonimski, P. P. (1980). *Cell* 22, 333-348.
- Lerner, M. R., Boyle, J. A., Mount, S. M., Wolin, S. L. und Steitz, J. A. (1980). *Nature* 283, 220-224.
- Lewin, B. (1980). *Cell* 22, 324-326.

- Locker, J. (1979). *Anal. Bioch.* 98, 538-367.
- Maniatis, T., Frisch, E. F. und Sambrook, J. (1982). In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Maxam, A. M. und Gilbert, W. (1980). *Meth. Enz.* 65, 499-560.
- Mc Donnell, M. W., Simon, M. N. und Studier, F. W. (1977). *J. Mol. Biol.* 110, 119-146.
- Messing, J. (1983). *Meth. Enz.* 101, 20-78.
- Messing, J. und Vieira, J. (1982). *Gene* 19, 269-276.
- Michel, F. und Dujon, B. (1983). *EMBO J.* 2, 33-38.
- Michel, F., Jacquier, A. und Dujon, B. (1982). *Biochimie* 64, 867-881.
- Nargang, F. E., Bell, J. B., Stohl, L. L. und Lambowitz, A. M. (1984). *Cell* 38, 441-453.
- Padgett, R. A., Konarska, M. M., Grabowski, P. J., Hardy, S. F. und Sharp, P. A. (1984). *Science* 225, 898-903.
- Peebles, C. L., Dietrich, R. C., Perlman, P. S., Petrillo, M. L., Mecklenburg, K. L. und Romiti, S. L. (1986). *Cell* 44, 213-223.
- Perea, J. und Jacq, C. (1985). *EMBO J.* 4, 3281-3288.
- Pikielney, C. W., Teem, J. L. und Rosbash, M. (1983). *Cell* 34, 395-403.
- Reed, R. und Maniatis, T. (1985). *Cell* 41, 95-105.
- Rigby, P. W. J., Dieckman, M., Rhodes, C. und Berg, P. (1977). *J. Mol. Biol.* 113, 237- 251.
- Rodriguez, J. R., Pikielney, C. W. und Rosbash, M. (1984). *Cell* 39, 603-610.

- Rogers, J. und Wall, R. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1877-1879.
- Ruskin, B. und Green, M. R. (1985). *Science* 229, 135-140.
- Ruskin, B., Krainer, A. R., Maniatis, T. und Green, M. R. (1984). *Cell* 38, 317-331.
- Saigo, K., Kugimija, W., Matsuo, Y., Inouye, S., Yoshioka, K. und Yuki, S. (1984). *Nature* 312, 659-661.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schmelzer, C., Schmidt, C., May, K. und Schweyen, R. (1983). *EMBO J.* 2, 2047-2052.
- Schmidt, F. J. (1985). *Cell* 41, 339-340.
- Schwartz, D. E., Tizard, R. und Gilbert, W. (1983). *Cell* 32, 853-869.
- Slonimski, P. P., Pajot, P., Jacq, C., Foucher, M., Perrodin, G., Kochko, A. und Lamouroux, A. (1978). In: *Biochemistry and Genetics of Yeast: Pure and Applied Aspects*, pp 339-368 (Bacila, M., Horecker, B. L., Stoppani, A. O. M., eds.) New York, Academic Press.
- Southern, E. M. (1975). *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Steinbiller, W. und Cummings, D. (1986). *Curr. Genet.* 10, 389-392.
- Tabak, H. F., Van der Horst, G., Osinga, K. A. und Arnberg, A. C. (1984). *Cell* 39, 623-629.
- Thomas, P. S. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5201-5205.
- Toh, H., Hayashida, H. und Miyata, T. (1983). *Nature* 305, 827-829.
- Treisman, R., Orkin, S. H. und Maniatis, T. (1983). *Nature* 302, 591-596.

- Trinkl, H., Lang, B. F. und Wolf, K. (1985). Mol. Gen. Genet. 198, 360-363.
- Tu, C. D. und Cohen, S. N. (1980). Gene 10, 177-183.
- Valenzuela, P., Venegas, A., Weinberg, F., Bishop, R. und Rutter, W. J. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 190-194.
- Van der Horst, G. und Tabak, H. F. (1985). Cell 40, 759-766.
- Van der Veen, R., Arnberg, A. C., Van der Horst, G., Bonen, L., Tabak, H. F. und Grivell, L. A. (1986). Cell 44, 225-234.
- Van Ommen, G. J. B., Groot, G. S. P. und Grivell, L. A. (1979). Cell 18, 511-523.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982). Gene 19, 259.
- Wallace, J. C. und Edmonds, M. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 950-954.
- Waring, R. B., Davies, R. W., Lee, S., Grisi, E., Berks, M. M. und Scazzocchio, C. (1981). Cell 27, 4-11.
- Waring, R. B. und Davies, R. W. (1984). Gene 28, 277-291.
- Weiß-Brummer, B., Holl, J., Schweyen, R. J., Rödel, G. und Kaudewitz, F. (1983). Cell 33, 195-202.
- Wright, R. M. und Cummings, D. J. (1983). Curr. Genet. 7, 457-464.
- Zassenhaus, H. P., Butow, R. A. und Hannon, Y. P. (1982). Anal. Bioch. 125, 125-130.
- Zaug, A. J., Grabowski, P. J. und Cech, T. R. (1983). Nature 301, 578-583.
- Zeitlin, S. und Efstratiadis, A. (1984). Cell 39, 589-602.
- Zinn, K., Di Maio, D. und Maniatis, T. (1983). Cell 34, 865-879.

LEBENS LAUF

1958 geboren in München

1964-1968 Grundschule München

1968-1977 Gymnasium München (mathem.-naturwissensch.)

1977 Abitur

1977-1983 Studium der Biologie an der Universität München

1983 Diplom

1983-1986 Dissertation am Institut für Genetik und

Mikrobiologie der Universität München, Lehrstuhl

für Genetik

